



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID**  
**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRÓNOMOS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA**



# **ANÁLISIS DE SISTEMAS DE SECRECIÓN DE PROTEÍNAS EN *BRADYRHIZOBIA* AISLADOS DE *LUPINUS* SPP. DE LA PENÍNSULA IBÉRICA**

**TRABAJO FIN DE CARRERA**

**VÍCTOR PASTOR MARTÍN**

**MADRID, JULIO 2013**

VICTOR PASTOR MARTÍN

Trabajo de Fin de Carrera

ANÁLISIS DE SISTEMAS DE SECRECIÓN DE  
PROTEÍNAS EN BRADYRHIZOBIA AISLADOS  
DE *LUPINUS* SPP DE LA PENÍNSULA IBÉRICA

Tutor:

Luis Rey Navarro

**Departamento de Biotecnología**

**Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos**

**Universidad Politécnica de Madrid**

**Madrid, julio 2013**

Esta memoria ha sido escrita y presentada para optar al Título de Ingeniero Agrónomo  
por la Universidad Politécnica de Madrid

El autor de este proyecto:

Víctor Pastor Martín

VºBº

Fdo: Luis Rey Navarro

Madrid, julio 2013

## **Agradecimientos:**

Quiero dar las gracias a todo el laboratorio de Microbiología, del Departamento de Biotecnología, que me ha dado la oportunidad de desarrollar este trabajo a su lado. Sin el apoyo, consejo y las aportaciones de Ana, Mónica, Rosabel, David, Laura, Marta, Mariana, Benjamín, Beatriz, Manuel, Tomás, Belén, Pepe y David no hubiera sido posible llegar hasta aquí.

En especial tengo que dar gracias a mi tutor Luis Rey, que ha sido un apoyo constante en todo mi proyecto. Desde las clases en la escuela hasta el día de hoy he aprendido de él, con su paciencia y sus ganas de siempre de ir más allá.

A mis amigos, que cada uno a su manera, me hacen saber que tengo la suerte de tener siempre gente con quien contar.

A Joany, que siempre estuvo a mi lado y me hizo pensar en la ilusión del día siguiente.

Y por último mi familia, en especial a mis abuelos de ambos lados, que cada uno a su manera, me dieron lo mejor que tenían, y a mis padres por su apoyo y ayuda en todo lo que hago.

## ÍNDICE DE FIGURAS

## ÍNDICE DE TABLAS

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	3
1. Las Leguminosas	3
2. Importancia de la simbiosis <i>Rhizobium</i> -leguminosa	4
2.1. La simbiosis <i>Bradyrhizobium-Lupinus</i>	
2.2. <i>Lupinus spp.</i>	
2.2.1. <i>L. mariae-josephae</i>	
2.2.2. <i>Lupinus angustifolius</i>	
2.3. <i>Bradyrhizobium</i>	
3. Sistemas de secreción de proteínas en bacterias	8
3.1. Sistemas de secreción de tipo III (SSTIII)	
3.2. Sistema de secreción de tipo VI (SSTVI)	
4. Otras simbiosis <i>Bradyrhizobium</i> -leguminosa	12
OBJETIVOS	14
MATERIAL Y MÉTODOS	16
1. Material biológico	16
1.1 Bacterias y plásmidos	
1.2 Leguminosas empleadas en este trabajo	
2. Medios y condiciones de cultivos	17
2.1. Medios de cultivo	
2.2. Condiciones de cultivo	
3. Análisis bioinformáticos	17
3.1. Análisis de secuencias	
3.2. Árboles filogenéticos	
4. Extracción de ADN total	18

5. Amplificación de ADN por PCR	18
6. Extracción de plásmidos de <i>E.coli</i>	18
7. Electroforesis en geles de agarosa	19
8. Transformación	19
9. Conjugación	19
10. Germinación de semillas	19
11. Inoculación de plantas	19
12. Medición de reducción de acetileno	20
13. Oligonucleótidos	20
13.1. Diseño de primers	
13.2. Enzimas y reactivos	
14. Generación de una mutación en el gen <i>ttsI</i> de la cepa <i>B.sp.</i> LmjC	21
15. Generación de mutaciones en los genes <i>impC1</i> , <i>impC2</i> e <i>impO</i> de la cepa ISLU101	22
16. Generación de mutaciones en los genes <i>impC</i> , <i>impO</i> e <i>impS</i> de la cepa USDA110	23
RESULTADOS	25
1. Sistema de secreción tipo III en <i>Bradyrhizobium sp.</i> LmjC	25
1.1. Filogenia del gen <i>ttsI</i> de <i>Bradyrhizobium sp.</i> LmjC y de otros <i>Bradyrhizobios</i>	
1.2. Presencia de cajas <i>tts</i> en el genoma de <i>B.sp.</i> LmjC	
1.3. Fenotipo simbiótico de un mutante <i>ttsI</i> en la cepa LmjC	
2. Sistema de secreción tipo VI en <i>Bradyrhizobium sp.</i> ISLU101	32
2.1. Filogenia de los SSTVI de <i>Bradyrhizobium sp.</i> ISLU101 y de otros <i>bradyrhizobios</i>	
2.2. Fenotipo simbiótico de mutantes en genes de los SSTVI de <i>B.sp.</i> ISLU101	
3. Sistema de secreción tipo VI en <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA110	39
3.1. Ensayos con soja	
3.2. Ensayos con caupí	

DISCUSIÓN	45
1. El SSTIII de Bradyrhizobium sp LmjC	45
1.1. Importancia del SSTIII en la simbiosis de LmjC- <i>L.mariae-josephae</i>	
2. Los SSTVI de <i>B.sp.</i> ISLU101	47
3. El SSTVI de <i>B.japonicum</i> USDA110	48
CONCLUSIONES	52
BIBLIOGRAFÍA	54
ANEXO	58

## ÍNDICE DE FIGURAS:

Fig.1. Producción mundial de lupinos por países	5
Fig.2. Flores de <i>L. mariae-josephae</i> y de <i>L. angustifolius</i>	6
Fig.3. Sistemas de secreción de proteínas de bacterias Gram negativas	8
Fig.4. Esquema de la estructura de un sistema de secreción tipo III de <i>Pseudomonas</i>	9
Fig.5. Esquema de la estructura de un sistema de secreción de tipo VI	10
Fig.6. Generación de una mutación en el gen <i>ttsI</i> de la cepa <i>B. sp</i> LmjC	21
Fig.7. Generación de una mutación en el gen <i>impC1</i> de la cepa <i>B. sp</i> ISLU101	22
Fig.8. Organización génica y comparación del SSTIII de <i>B. sp</i> . LmjC y otros <i>Bradyrhizobia</i>	27
Fig.9. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en el gen <i>ttsI</i> de Bradyrhizobios analizados en este trabajo	28
Fig.10. Homología de genes <i>ttsI</i> y motivos conservados	29
Fig.11. Fenotipo de plantas de <i>L. mariae-josephae</i> tras 40 días de ser inoculada	31
Fig.12. Peso de la parte aérea de plantas de <i>L. mariae-josephae</i> tras 40 días de ser inoculadas	31
Fig. 13. Organización génica y comparación de los dos SSTVI de <i>B. sp</i> . ISLU101 y otros <i>Bradyrhizobia</i>	33
Fig.14. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en la concatenación de <i>ImpA</i> , <i>ImpB</i> , <i>ImpC</i> , <i>ImpF</i> , <i>ImpH</i> , <i>ImpI</i> , <i>ImpJ</i> , <i>ImpK</i> , <i>ImpN</i> , <i>ImpO</i> e <i>ImpS</i> de Bradyrhizobios	35
Fig.15. Estructura de un SSTVI	36
Fig.16. Fenotipo y parte aérea de <i>L.angustifolius</i>	37
Fig.17. Nódulos en <i>L.angustifolius</i>	38
Fig.18. Fenotipo y parte aérea de <i>Glycine max</i>	40
Fig.19. Nódulos en <i>Glycine max</i>	41
Fig.20. Fenotipo y parte aérea de <i>Vigna unguiculata</i>	42



Fig.21. Nódulos en <i>Vigna unguiculata</i>	43
Fig.22. Composición del SSTVI	50
Fig.23. Alineamiento de proteínas ImpC	60
Fig.24. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en la proteína ImpC de <i>Bradyrhizobios</i>	60
Figura 25. Alineamiento de proteínas ImpS	61
Fig. 26. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en la proteína ImpS de <i>Bradyrhizobios</i>	61
Fig. 27. Alineamiento de proteínas ImpO	62
Fig. 28. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en la proteína ImpO de <i>Bradyrhizobios</i>	62

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de las semillas de diferentes especies de <i>Lupinus</i> .	7
Tabla 2. Bacterias y plásmidos utilizados en este trabajo	16
Tabla 3. Leguminosas empleadas en este trabajo	16
Tabla 4. Oligonucleótidos empleados en este trabajo	20
Tabla 5. Presencia del gen <i>ttsI</i> en cepas secuenciadas por nuestro laboratorio	23
Tabla 6. Cajas <i>tts</i> identificadas en el genoma de <i>B.sp.</i> LmjC	26
Tabla 7. Incremento en la expresión de genes del SSTVI de <i>B.japonicum</i> USDA 110 en simbiosis con soja frente a vida libre	49
Tabla 8. Conservación de proteínas del SSTVI-1 de la cepa ISLU101 con las de otras bacterias.	59

## **ABREVIATURAS:**

aa: aminoácidos

ADN: ácido desoxiribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

Fig: figura

g: gramos

kb: kilobases

Km: kanamicina

NCBI: National Center for Biotechnology Information

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

Rpm: revoluciones por minuto

SDS: DODECIL SULFATO SÓDICO

sp: especie

T: tonelada

# **INTRODUCCIÓN**

# Introducción

---

## 1. Las Leguminosas

Las plantas leguminosas, pertenecen a la subclase Rosidae, orden Fabales y forman la familia Fabaceae con tres subfamilias Mimosoideas, Cesalpinoideas y Faboideas. Comprenden 700 géneros y aproximadamente 17.000 especies que incluyen árboles, arbustos y plantas herbáceas. El porte varía dependiendo de la subfamilia. Las Cesalpinoideas y Mimosoideas suelen ser árboles o arbustos, mientras que entre las Papilionoideas predomina el porte herbáceo. Las leguminosas poseen hojas generalmente alternas, pinnaticompuestas y con estípulas. Las estípulas pueden convertirse en espinas o en hojas y los folíolos, cuando los tienen, varían de 3 a 12 pares. La inflorescencia es de racimo erecto o penduloso. Las flores suelen ser hermafroditas, con 5 pétalos y 5 sépalos. El gineceo tiene un carpelo único y súpero, con un número de óvulos variables. Los estambres son numerosos. El fruto es en general tipo legumbre, con dehiscencia dorsal y ventral, aunque puede presentarse en algún género en forma de lomento. (UPV, 2013)

Existen muchos usos para las leguminosas: plantas ornamentales, fuente de sustancias para farmacia o melíferas pero su uso más importante es en alimentación tanto ganadera como humana. Su uso alimentario se debe al alto contenido proteico de sus semillas. También son una buena fuente de minerales como Ca, Fe, Cu, Zn, P, K y Mg, así como de vitaminas hidrosolubles, especialmente tiamina, riboflavina, niacina, etc. En relación con la salud, la ingestión de algunas leguminosas producen una disminución del colesterol posiblemente debido a su alto contenido en fibra dietética y también pueden ayudar a reducir los niveles de glucosa sanguínea a los diabéticos. Entre los factores negativos se puede reseñar la deficiencia en aminoácidos azufrados y la existencia de los llamados antinutrientes, compuestos que en general dificultan la asimilación por los organismos vivos de algunos de sus componentes, y en algunos casos pueden llegar a ser tóxicos o causar efectos fisiológicos no deseables. Estos compuestos pueden ser inhibidores de proteasas, de amilasas, de lectinas, glicósidos, aminoácidos libres, alcaloides. Estos compuestos juegan un papel importante como defensa de la planta frente al ataque de depredadores o se acumulan en las semillas para su uso en el proceso germinativo. Recientemente se ha visto que en pequeñas cantidades pueden ser beneficiosos para enfermedades coronarias o cáncer, llamándolas “Compuestos Biológicamente activos” (BAC en inglés). (Múzquiz M, 1998)

# Introducción

---

España es importadora neta de leguminosas, a pesar de ser el tercer productor de la UE en leguminosas proteaginosas (guisantes, altramuza, habas, etc.). En los últimos años la producción tanto mundial como española ha decrecido, en su mayor parte debido al menor consumo de las legumbres clásicas como lentejas y garbanzos, aunque al mismo tiempo otros cultivos han experimentado mayor auge como en el caso de la soja. Casi el 90% de la superficie española dedicada a su cultivo es en regadío, con una superficie total de 766 ha. (Anuario Estadística 2011 MAGRAMA)

## 2. Importancia de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa

El uso de las leguminosas para mejorar suelos agrícolas se conoce desde la Antigüedad. Esta mejora se produce gracias a la simbiosis que se establece entre la mayoría de las leguminosas y bacterias del suelo denominadas rizobios que pertenecen a diferentes géneros de  $\alpha$  y  $\beta$  proteobacterias. Dichos rizobios fijan nitrógeno de la atmósfera en unas estructuras especializadas de las raíces denominadas nódulos. La relación simbiótica es en general específica entre un tipo de rizobio y un tipo de leguminosa. En primer lugar y de forma más frecuente el rizobio reconoce exudados de determinadas leguminosas como flavonoides y responde con la secreción de unos lipoquitooligosacáridos conocidos como factores Nod, que a su vez inducen una respuesta de la planta que culmina con la formación de los nódulos infectados de rizobios que se diferencian en lo que se conoce como bacteroides y que fijan nitrógeno. En contrapartida, la planta provee a la bacteria de un entorno seguro y de un continuo suministro de fuentes de energía derivadas de fotosintatos. (Villalobos, 2006).

### 2.1. La simbiosis *Bradyrhizobium-Lupinus*

Este trabajo forma parte de un proyecto de investigación para conservar una leguminosa endémica de Valencia, *Lupinus mariae-josephae* Pascual. La mayoría de las leguminosas se benefician de una interacción con bacterias del suelo llamadas rizobios que le aportan el nitrógeno que fijan de la atmósfera. En el proyecto de investigación mencionado se pretende conocer los rizobios de este *Lupinus* y compararlo con los

# Introducción

---

rizobios de otros *Lupinus* de la península ibérica incidiendo sobre todo en determinantes genéticos que tengan importancia en la simbiosis.

## 2.2. *Lupinus spp.*

Los lupinos tienen gran importancia en la dieta humana y animal desde la antigüedad por su alto contenido en proteínas y por su adaptación a suelos pobres. En español las especies del género *Lupinus* se conocen con varios nombres que indican su gran importancia en diferentes culturas como, lupinos del latín, altramuces del árabe o chochos del quechua.

El género *Lupinus* está formado por más de 200 especies distribuidas por Europa y mayoritariamente por América. Pertenece a la tribu *Genisteae* de la subfamilia *Faboideae*. Son plantas generalmente anuales, de raíces profundas, siendo las principales muy fuertes. Tienen hojas digitadas con varios foliolos (5 a 15), inflorescencias terminales muy visibles en racimo erecto con numerosas flores con corola de colores variados y androceo monoadelfo. El fruto se forma en vainas comprimidas, de forma oval o cuadrangular, conteniendo de 3 a 5 semillas y generalmente por fecundación autógama. La ramificación es dicotómica, pudiendo tener tres y hasta cuatro estratos de ramificaciones, apareciendo las inflorescencias en los puntos de ramificación. Su apariencia es generalmente herbácea alcanzando hasta un metro de altura (U.P. de Navarra, 2013). En la península ibérica crecen en suelos ácidos, seis lupinos nativos: *L. angustifolius* L, *L. cosentinii* Guss, *L. hispanicus* Boiss & Reut, *L. gredensis* Gand, *L. luteus* L y *L. micranthus* Guss y dos naturalizados: *L. albus* L y *L. pollyphyllus* Lindl (Castroviejo et Pascual, 1999) y en suelo básico una sorprendente especie: *Lupinus mariae-josephae* H. Pascual ya que es, hasta el momento, la única especie que crece preferentemente en suelos alcalinos (Pascual, 2004).

Australia es el mayor productor mundial de lupinos, con una producción de 629.000 t representando un 67% de la producción mundial, seguido muy de lejos por Chile con 73.325 t, ver Figura 1. España es el octavo productor con 3.700 t en una superficie de 6000 ha (FAO, 2010) de las cuales 5.985 ha son de secano, con una producción de 3,7 t de grano. La región productora más importante es Castilla y León con 3.663 ha, seguida de Extremadura, Andalucía, Castilla la Mancha y Canarias. (Anuario Estadística 2011 MAGRAMA) El cultivo de altramuz ha disminuido ligeramente en los últimos años,

# Introducción

---

aunque su gran auge fue en la década de los 60. Su caída en consumo se debe a la presencia de alcaloides, en torno al 2% que exige un proceso de desamargamiento que es costoso y complicado y la gran producción de soja.

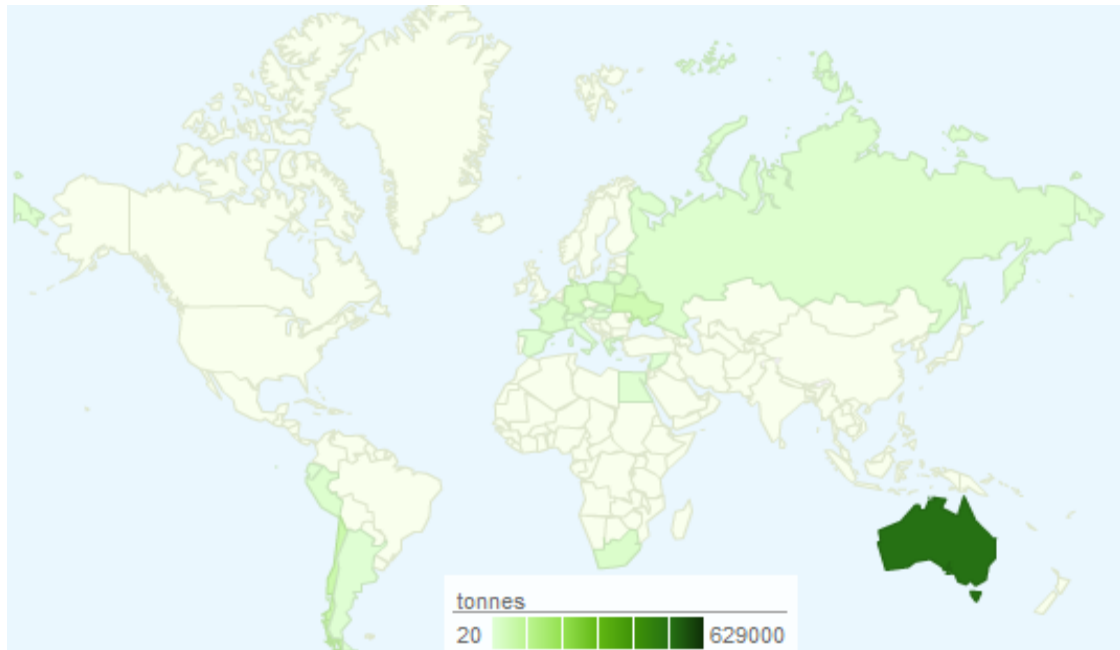


Figura 1. Producción mundial de lupinos por países. Tomado de base de datos FAO, 2010

La variedad típicamente cultivada en España es el *Lupinus albus*. En la actualidad se cultivan los llamados altramuces dulces, variedades en las que la mejora genética ha eliminado el contenido en alcaloides hasta niveles de menos de 0,05%. Existen variedades dulces de *Lupinus albus*, *Lupinus angustifolius* y *Lupinus luteus*.

En la actualidad, su uso se ha centrado como forrajera y en la composición de piensos para ganadería o incluso acuicultura, pudiéndose utilizar sin limitación alguna en rumiantes, con aportes de metionina y lisina en monogástricos, debido a su baja proporción de aminoácidos azufrados. Además, se sigue utilizando para consumo humano como aperitivo preparado en salmuera y cada vez se ve más como planta ornamental. Los lupinos pueden ser un sustituto de la soja ya que se adaptan bien a suelos más pobres y arenosos, soportan bien heladas y altas temperaturas y contienen un contenido proteico (45%) similar al de la soja. (Guerrero, 1998)



# Introducción

Tabla 1. Composición de las semillas de diferentes especies de *Lupinus*. (Guerrero, 1998)

	<i>L. albus</i>	<i>L. mutabilis</i>	<i>L. angustifolius</i>	<i>L. luteus</i>
Proteínas .....	30-48	40-50	30-40	32-48
Lisina .....	4,5-5,0	5,2-6,0	4,5	4,9
Aceite .....	10-12	12-20	7	7
Glúcidos solubles .....	10-14	10	8	10
Cenizas .....	3,5	3,5	3,5	3,5
Celulosas .....	11	7	15	17
Alcaloides .....	0,005-1,5	0,5-2	0,02-1,5	0,02-1

## 2.2.1. *L. mariae-josephae*

*L. mariae-josephae* presenta una mezcla de flores blanco-amarillenta y más tarde rojas. La característica principal de este *Lupinus* es que a diferencia del resto, crece en suelos básicos con alta concentración de carbonato cálcico y se podría utilizar para la recuperación de suelos básicos pobres o degradados. (Pascual, 2004)

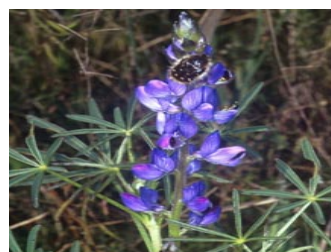


Figura 2. Flores de *L. mariae-josephae* (izda.) y de *L. angustifolius* (dcha)

## 2.2.2. *Lupinus angustifolius*

Este lupino tiene flores azules y su nombre hace referencia a que presenta hojas estrechas, se le llama altramuz de hoja estrecha o altramuz azul. Es el más utilizado en nuestro país en alimentación animal. Sólo se utilizan las variedades de tipo dulce originarias de Australia. En España las formas silvestres se encuentran generalmente en la costa mediterránea en suelos ácidos con bosques degradados, matorrales abiertos, márgenes de camino, tierras de cultivo, etc. (U.Islas Baleares, 2013)

# Introducción

---

## 2.3. *Bradyrhizobium*

Las bacterias que inducen la formación de nódulos en plantas leguminosas son un grupo polifilético colectivamente llamado rizobios. En la actualidad la clasificación taxonómica de bacterias está basada principalmente en las secuencias del gen *rrs* que codifica para la subunidad 16S de rARN. Esta clasificación ubica a todos los rizobios descritos hasta el momento entre las proteobacterias, la mayoría en la subclase  $\alpha$  y el resto en la subclase  $\beta$ . La subclase  $\alpha$  contiene 4 familias con rizobios, una de ellas *Bradyrhizobiaceae*, incluye el género *Bradyrhizobium*. Este género contiene varias especies cuyo genoma está constituido por un sólo cromosoma de entre 8.000 y 9.000 kb ya que la presencia de plásmidos es infrecuente. La información genética para la simbiosis suele estar agrupada en una región del cromosoma llamada isla simbiótica.

Ya se ha mencionado en el apartado 2.1 que este trabajo pretende estudiar determinantes genéticos que tengan importancia en la simbiosis de dos cepas que pertenecen al género *Bradyrhizobium*, que se denominan *B.sp* LmjC y *B.sp*. ISLU101 y que han sido aisladas de nódulos de *L. mariae-josephae* y *L. angustifolius*, respectivamente. Entre los determinantes que participan en la simbiosis se encuentran los genes que producen los factores Nod, los relacionados con la producción de exopolisacáridos (Broughton, et al., 2006) y los que producen sistemas de secreción de proteínas. (Marie, et al., 2004) Respecto a estos últimos, gracias a la disponibilidad de la secuencia genómica de estas cepas en nuestro laboratorio, se ha identificado un sistema de secreción de tipo III (SSTII) en la cepa *B.sp*. LmjC y dos sistemas de secreción de tipo VI (SSTVI) en la cepa *B.sp*.ISLU101 (López Ayala, 2011). Las características más importantes de estos sistemas de secreción se indican en el apartado siguiente.

## 3. Sistemas de secreción de proteínas en bacterias

Las bacterias secretan un gran número de proteínas al medio extracelular entre las que se incluyen toxinas, adhesinas y diversas enzimas hidrolíticas que se requieren en diferentes aspectos del ciclo de vida bacteriano. En bacterias gram-negativas, al proceso de transportar determinadas proteínas desde su lugar de síntesis en el citoplasma, atravesando la envuelta celular (membrana interna, periplasma y membrana externa), al exterior celular se le llama secreción de proteínas (Gonzalez-Pedrajo and Dreyfus,

# Introducción

2003). La secreción de proteínas es un proceso complejo que se lleva a cabo por seis tipos de complejos proteicos conocidos como sistemas de secreción Tipos I-VI (Holland, 2010), (ver Fig. 3). Una bacteria determinada puede poseer uno o más tipos de estos sistemas. Los 6 tipos son muy diferentes, por ejemplo, pueden actuar en un sólo paso o en dos, (Rego et al.) pueden liberar los sustratos al medio o liberarlos dentro de una célula eucariótica, puede tener desde tres componentes proteicos hasta más de 20. Los sistemas de tipo III, IV y VI pueden liberar los sustratos dentro de una célula eucariótica en un solo paso. En este trabajo se han estudiado los sistemas III y VI. Las proteínas que se translocan desde la célula bacteriana a la célula eucariótica se llaman efectores.

## 3.1. Sistemas de secreción de tipo III (SSTIII)

El SSTIII es uno de los sistemas de secreción más ampliamente estudiados en bacterias, principalmente en patógenos de animales y plantas (Büttner, 2012) y en menor medida en simbioses como los rizobios. Ha sido identificado en especies de *Salmonella*, *Erwinia*, *E. coli*, *Pseudomonas* y *Bradyrhizobium* entre otros. Este sistema forma una nanomáquina con más de 20 componentes que vienen codificados por una o varias agrupaciones de genes. Se forma una estructura similar al pilus que sirve de canal para transportar las proteínas a la célula eucariótica. En la Fig. 4 se presenta un esquema de esta estructura con el nombre de los componentes que se utiliza para rizobios rhc: *Rhizobium* conserved

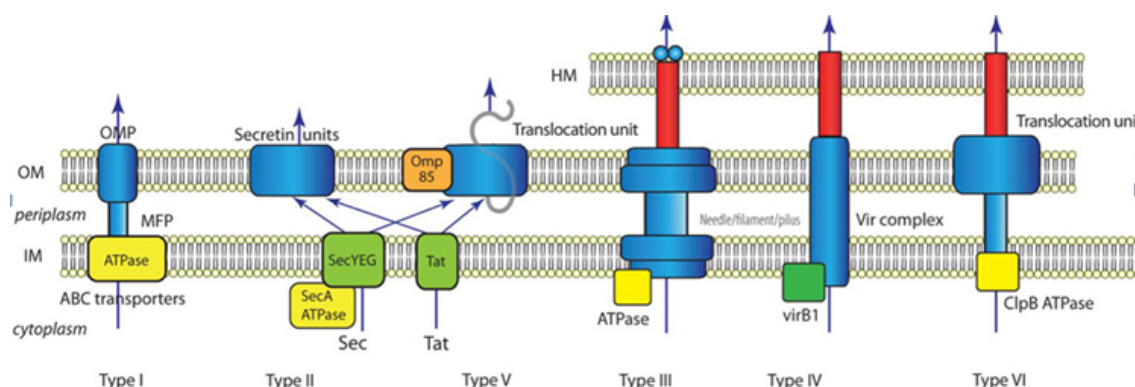


Figura 3. Sistemas de secreción de proteínas de bacterias Gram negativas. Figura modificada de Tseng et al., 2009

# Introducción

Este sistema se ha identificado en varios rizobios (ver Fig 13 en resultados) y el mejor estudiado es el de *B. japonicum* USDA 110. La expresión del SSTII en esta bacteria está regulada de forma coordinada con la expresión, entre otros, de los factores de nodulación, que dependen del regulador NodD que se activa en presencia de compuestos específicos de la leguminosa hospedadora como los flavonoides. NodD activo se une a determinadas cajas *nod* e inicia la expresión de determinados genes *rhc*, entre ellos el regulador transcripcional *ttsI*. (Wassem et al.2008).

Los SSTIII de rizobios pueden afectar de forma positiva, negativa o no tener efecto en el proceso de nodulación con la leguminosa hospedadora, dependiendo de las simbiosis (Marie et al. 2003).

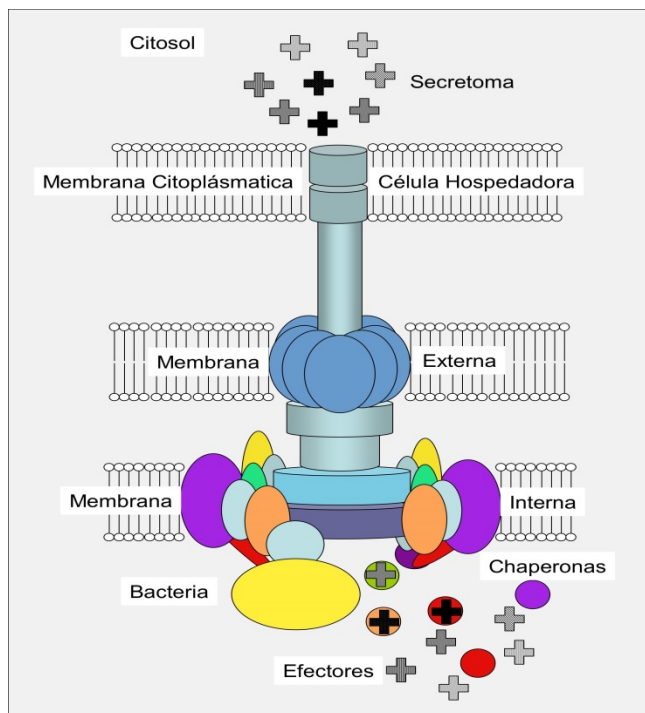
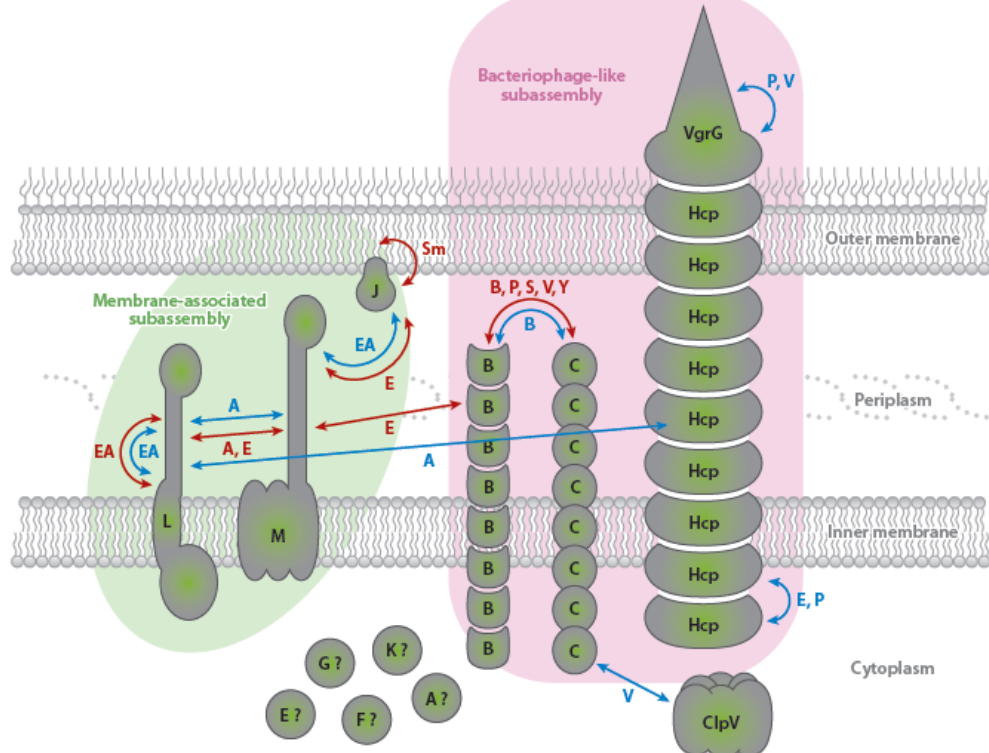


Figura 4. Esquema de la estructura de un sistema de secreción de tipo III de *Pseudomonas* (Beuzón, 2013)

## 3.2. Sistema de secreción de tipo VI (SSTVI)

El sistema de secreción tipo VI se describió inicialmente en *Vibrio cholerae* y *Pseudomonas aeruginosa* en 2006, a continuación se describió en numerosas bacterias Gram negativas implicado en interacción con células eucarióticas (ver revisión de Coulthurst, 2013). En 2010 se describió un nuevo papel como sistema con actividad



## 4. Otras simbiosis *Bradyrhizobium*-leguminosa

En este trabajo se decidió incluir a *Bradyrhizobium japonicum* USDA110, un endosimbionte de soja (*Glycine max* L), al encontrar una altísima conservación entre uno de los sistemas de secreción de tipo VI de la cepa *B.sp.* ISLU101 con el de la *B.japonicum* USDA110. La simbiosis *Bradyrhizobium*-soja es una de las mejor estudiadas por la gran importancia económica que tiene sobre todo en alimentación animal y como fuente de biocombustibles (la soja es la leguminosa con mayor producción a nivel mundial (260915871 t) (FAOSTAT, 2011) y en estos momentos se conocen las secuencias completas de ambos simbioses (Kaneko, 2002).

La cepa *B.japonicum* USDA 110 es también capaz de nodular *Vigna unguiculata* (caupí). El caupí se cultiva fundamentalmente como forrajera.

## **OBJETIVOS**

# Objetivos

---

La identificación de un SSTIII y de dos SSTVI en las cepas *B.sp.LmjC* e *B.sp. ISLU101* respectivamente y la disponibilidad de las secuencias prácticamente completas de ambas nos permitió plantear los siguientes objetivos:

- 1- Estudiar la importancia del SSTIII de la cepa *B.sp. LmjC* en la simbiosis con *L. mariae-josephae* mediante mutación del gen regulador *ttsI*
- 2- Realizar un análisis filogenético del gen *ttsI*
- 3- Estudiar la importancia de los SSTVI de la cepa ISLU101 en la simbiosis con *L. angustifolius* mediante mutación de *impC1*, *impC2*, *impS1* e *impO*
- 4- Realizar un análisis filogenético de SSTVI-1 y SSTVI-2 de la *B.sp.ISLU101*
- 5- Estudiar la importancia de los SSTVI de la cepa USDA110 en la simbiosis con *Glycine max*, y *Vigna unguiculata* mediante mutación de *impC*, *impS* e *impO*



## **MATERIAL Y MÉTODOS**

# Material y Métodos

## 1. Material biológico

### 1.1. Bacterias y plásmidos

Las cepas bacterianas y plásmidos utilizadas en este trabajo se recogen en la Tabla 2.  
Tabla 2. Bacterias y plásmidos utilizados en este trabajo.

Bacteria o plásmido	Características relevantes	Referencia
<b>Bacteria</b>		
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	Cepa de clonaje	Gibco-BRL
S17.1	Cepa conjugativa	Simon et al., 1983
<i>Bradyrhizobium</i>		
<i>B. sp.</i> LmjC	Aislada de <i>Lupinus mariae-josephae</i> H. Pascual	Sanchez-Cañizares et al., 2011
<i>B. sp.</i> LmjCttsI	Mutante LmjC ttsI <sup>-</sup> , Km <sup>r</sup>	Este trabajo
<i>B. sp.</i> LmjM1	Aislada de <i>L. mariae-josephae</i>	Duran et al., 2013
<i>B. sp.</i> LmjG2.10	Aislada de <i>L. mariae-josephae</i>	Duran et al., 2013
<i>B. sp.</i> LmjM3	Aislada de <i>L. mariae-josephae</i>	Duran et al., 2013
<i>B. sp.</i> LmjH2P	Aislada de <i>L. mariae-josephae</i>	Duran et al., 2013
<i>B. sp.</i> LmjLI9	Aislada de <i>L. mariae-josephae</i>	Duran et al., 2013
<i>B. sp.</i> LMTR13	Aislada de <i>Phaseolus lunatus</i>	Ormeño-Orrillo, et al., 2006
<i>B.sp.</i> LMTR21	Aislada de <i>P. lunatus</i>	Ormeño-Orrillo, et al., 2006
<i>B.sp.</i> RST89	Aislada de <i>Retama sphaerocarpa</i>	Boulila et al., 2009
<i>B.sp.</i> RSA104	Aislada de <i>R. sphaerocarpa</i>	Boulila et al., 2009
<i>B.sp.</i> RSB6	Aislada de <i>R. sphaerocarpa</i>	Boulila et al., 2009
<i>B.sp.</i> P22	Aislada de <i>L. mariae-josephae</i> de suelos mexicanos	Este laboratorio
<i>B.sp.</i> FP13	Aislada de <i>L. mariae-josephae</i> de suelos mexicanos	Este laboratorio
<i>B. lablabi</i> CCBAU23086	Aislada de <i>Lablabi purpureus</i>	Chang et al. , 2011
<i>B.elkanii</i> USDA76	Aislada de <i>Glycine max</i>	USDA <sup>2</sup>
<i>B.jicamae</i> PAC86	Aislada de <i>Pachyrhizus erosus</i>	Ramírez-Baena, et al., 2009
<i>B. sp.</i> ISLU101	Aislada de <i>L. angustifolius</i>	IFAPA <sup>1</sup>
<i>B. sp.</i> ISLU101impC1	Mutante ISLU101 impC1 <sup>-</sup> , Km <sup>r</sup>	Este trabajo
<i>B. sp.</i> ISLU101impC2	Mutante ISLU101 impC2 <sup>-</sup> , Km <sup>r</sup>	Este trabajo
<i>B. sp.</i> ISLU101impO	Mutante ISLU101 impO <sup>-</sup> , Km <sup>r</sup>	Este trabajo
<i>B. japonicum</i> USDA110	<i>Glycine max</i>	USDA <sup>2</sup>
<i>B. jap.</i> USDA110impC	Mutante USDA1101 impC <sup>-</sup> , Km <sup>r</sup>	Este trabajo
<i>B. jap.</i> USDA110impS	Mutante USDA1101 impS <sup>-</sup> , Km <sup>r</sup>	Este trabajo
<i>B. jap.</i> USDA110impO	Mutante USDA1101 impC <sup>-</sup> , Km <sup>r</sup>	Este trabajo

# Material y Métodos

## Plásmidos

pCR2.1 TOPO	Clonaje directo de productos de PCR. Km <sup>r</sup>	Invitrogen
pK18mobsacB	Movilizable, <i>sacB</i> confiere sensibilidad a sacarosa, Km <sup>r</sup>	Schafer et al., 1994

<sup>1</sup> Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (Centro Las Torres-Tomejil, Junta de Andalucía.)

<sup>2</sup> United States Department of Agriculture, Beltsville, MD (E.E.U.U.)

## 1.2. Leguminosas empleadas en este trabajo

Las leguminosas utilizadas en este trabajo se recogen en la Tabla 3.

Tabla 3. Leguminosas empleadas en este trabajo

Leguminosa	Rizobio específico
<i>Lupinus angustifolius</i> L	<i>Bradyrhizobium</i> sp. ISLU101
<i>Lupinus mariae-josephae</i> H. Pascual	<i>B. sp</i> LmjC
<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp cv. unguiculata	<i>B. japonicum</i> USDA110
<i>Glycine max</i> (L) Merr cv. Williams	<i>B. japonicum</i> USDA110

## 2. Medios y condiciones de cultivo

### 2.1. Medios de cultivo:

Las cantidades que se indican a continuación están referidas a un litro. Cuando se requirió medio sólido se añadieron 15 g de agar por litro. Todos los medios se prepararon con agua mili-Q y se esterilizaron por calor húmedo a 115°C durante 20 minutos.

LB (Luria-Bertani):

10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl

YMB (Yeast Mannitol Broth):

1 g manitol; 0.4 extracto de levadura; 0.1 g NaCl; 0,5 g K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0.2 g MgSO<sub>4</sub>; H<sub>2</sub>O hasta enrasar a 1 l; pH ajustado a 6.8 con HCl 2N (Vincent, 1970).

AG (arabinose-gluconate):

0.125 g Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0.25 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,32 g NH<sub>4</sub>Cl; 0.12 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0,0004 g FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O; 0,013 g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O; 1,3 g HEPES; 1,1 g MES; 5 g gluconato; 0,5 g L-arabinosa; 0,25 g extracto levadura; 1 l agua destilada. (Sadowsky et al. 1987)

## Material y Métodos

---

Cuando fue necesario añadir kanamicina se añadieron 50 mg/ml

### 2.2. Condiciones de cultivo

*Escherichia coli* se cultivó a 37° a 150 rpm en medio LB

*B. sp. LmjC* se cultivó 28° a 150 rpm en medio AG

*B. sp. ISLU101* se cultivó a 28° a 150 rpm en medio YMB

*B. japonicum* USDA110 se cultivó a 28° a 150 rpm en medio YMB

### 3. Análisis bioinformáticos

Las secuencias nucleotídicas y peptídicas de LmjC y ISLU101 están depositadas en la plataforma Manatee del Institute for Genome Sciences, School of Medicine, University of Maryland.

([http://manatee.igsumaryland.edu/tigrscripts/chado\\_prok\\_manatee/shared/login.cgi](http://manatee.igsumaryland.edu/tigrscripts/chado_prok_manatee/shared/login.cgi))

#### 3.1. Análisis de secuencias

Se empleó la plataforma Rhizobase (<http://genome.kazusa.or.jp/rhizobase/>) desarrollada por el Kazusa DNA Research Institute (Japón) para comparaciones con las secuencias de diferentes rizobios.

Se empleó el algoritmo BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) para comparar secuencias (Altschul et al., 1990).

#### 3.2. Árboles filogenéticos

Se empleó la plataforma de Phylogeny.fr (Dereeper et al., 2008) y el programa MEGA.4.1 (Tamura et al., 2007), para realizar los distintos árboles filogenéticos de máxima verosimilitud.

### 4. Extracción de ADN total

El ADN total de las cepas de rizobios se obtuvo rutinariamente para ensayos de PCR a partir de un cultivo en medio sólido. Para ello se diluyeron las bacterias recogidas con un asa de siembras en 10 µl de una solución de lisis (1% de SDS y 0.2 de N de NaOH), se sometieron a 85-90°C durante 15 minutos y posteriormente se añadieron 100 µl de agua estéril; la mezcla se centrifugó y se separó el sobrenadante con el ADN disuelto.

### 5. Amplificación de ADN por PCR

Para las reacciones e PCR de los genes *impC1*, *impC2*, *impO*, *impS* y *ttsI* se utilizaron los oligonucleótidos indicados en la Tabla 3. El programa de PCR utilizado para la amplificación fue de 5 minutos a 95°C, 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 ciclos de 30 segundos a 54-62°C dependiendo del gen a amplificar, 30 ciclos de 2 minutos a 72°C, 7 minutos a 72°C y una temperatura final de 4°C.

### 6. Extracción de plásmidos de *E. coli*

Se emplearon 1.5 ml de cultivo en un tubo eppendorf y la extracción de plásmido se llevó a cabo por lisis alcalina descrita por Birnboim and Doly, 1979.

### 7. Electroforesis en geles de agarosa

Los fragmentos de ADN se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa (1%) sumergidos en tampón TAE (Sambrook y Russell, 2001). Las muestras se mezclaron con ¼ (vol/vol) de tampón de carga (60% glicerol, 20 mM EDTA, 0,25% azul de bromofenol, 20 unidades de ribonucleasa A/ml). Se utilizó el marcador comercial de peso molecular GeneRuler 100bpDNA ladder Plus y marcador lambda de 1kb.

### 8. Transformación

Para la transformación se utilizaron 5 µl del ADN con 100 µl de células competentes DH5α. Se incubaron durante 30 minutos a en hielo. Al terminar se le dio un choque térmico a 50° durante 30 y se le añadió medio de cultivo previamente calentado a 37°. La mezcla se incubó en agitación durante una hora y se plaqueó.

### 9. Conjugación

Se utilizó 0.5 ml de la cepa transmisora (*E. coli*) y receptora (*Rhizobium*). Se centrifugó y eliminó el sobrenadante. Se resuspendió en TY y se utilizaron 60 µl en un papel de filtro en un placa de YMB. Se incubó a 28° durante un día.

## Material y Métodos

---

Al día siguiente se vorteo el filtro en 2 ml de TY y se plaqueó 100 µl en YMB Nitrofurantoina-Kanamicina.

### 10. Germinación de semillas

Se realizó en cámara de esterilidad. Se introdujeron en un vaso con alcohol 96° durante un minuto, y posteriormente a una dilución de lejía al 25% durante 3 minutos. Una vez esterilizado se realizaron sucesivos lavados con agua estéril hasta eliminar la lejía de las semillas. Se introdujeron en placas Petri con agar agua al 1% durante 4 días a temperatura ambiente convenientemente cubiertas.

### 11. Inoculación de plantas

Para inoculación de semillas se utilizaron macetas tipo Leonard con sustrato estéril. Se usaron semillas almacenadas a -4°. Se introdujeron a 2 cm bajo el sustrato y se les vertió las bacterias en forma de cultivo líquido directamente.

### 12. Medición de reducción de acetileno

Se cortaron las raíces noduladas y se introdujeron en los viales. Se tapó con tapón de goma. Se introdujo 0,5 ml de etileno mediante una jeringuilla y se extrajo 0,2 ml a los 15 y 30 minutos. Se analizó en el cromatógrafo y se anotaron los picos que produjeron.

### 13. Diseño de oligonucleótidos

Se empleó la plataforma Primer 3: WWW primer tool ([http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3\\_www.cgi](http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi)) Whitehead Institute for Biomedical Research

Se empleó la plataforma NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>) de NEW ENGLAND BioLabs para encontrar sitios de corte de enzimas de restricción y la plataforma Perform Promoter Prediction On Fasta Formatted DNA Sequences ([http://bioinformatics.biol.rug.nl/websoftware/ppp/ppp\\_start.php](http://bioinformatics.biol.rug.nl/websoftware/ppp/ppp_start.php)) para la predicción de promotores.

Tabla 4. Oligonucleótidos empleados en este trabajo.

## Material y Métodos

Nombre	Oligonucleótidos	Gen amplificado	Posición en el gen respecto al origen del gen	Tamaño de región amplificada
ttsI1	CAAATCTTCGAGCCGTTCTT	<i>ttsI</i>	-437 nt	2.100 pb
ttsI2	GATTGAAGCCGAACCTCTTG		1663 nt	
ImpC1.1	GGGTGATGAACGTCTCAAAGA	<i>impC1</i>	387 nt	497 pb
impC1.2	GCGTTGATCCAGCCATATTT		910 nt	
ImpC2.1	CCGAATGTTTCGGTGTCG	<i>impC2</i>	590 nt	474 pb
impC2.2	AGAACGCCGCATTGTCA		1064 nt	
ImpO1	CGATGAGGCCACACAC	<i>impO</i>	913 nt	484 pb
impO2	CAATGCGCTCGTTGTCC		1397 nt	
ImpS1.1	GCTGCCGAAATAGACGTGTT	<i>impS1</i>	656 nt	496 pb
impS1.2	ACTCCAAATCGTCGCATAGC		970 nt	

### 14. Enzimas y reactivos

Los reactivos utilizados fueron de grado analítico, procedentes de las compañías Merck (Darmstadt, Alemania), Sigma Chemical Co. (St. Louis, EEUU), Serva Feinbiochemica (Heidelberg, Alemania), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Alemania) y Panreac (Montplet & Esteban SA, Barcelona, España).

### 15. Generación de una mutación en el gen *ttsI* de la cepa *B. sp. LmjC*

Para mutar el gen *ttsI* se amplificó una región de ADN de 2.1 kb que lo contiene. El proceso se esquematiza en la Fig 1. En primer lugar se diseñaron los cebadores *ttsI1* y *ttsI2* (Tabla 2) con el programa Primer3: WWW primer tool. El amplicón se insertó en el plásmido comercial TOPO PCR2.1 y se transformaron células competentes de *E. coli* DH5α. A continuación se extrajo el plásmido y se eliminó una región SalI-SalI de 400 pb correspondiente a la zona 3' de *ttsI*. El fragmento de ADN con el gen *ttsI* deletado se digirió con las enzimas XbaI-PstI y se introdujo en el vector comercial pK18mobsacB. Posteriormente se transformó la cepa de *E. coli* S17 con el derivado de pK18mobsacB y la cepa resultante se conjugó con *B. sp. LmjC*. Se seleccionaron cepas de *LmjC* resistentes a Km y se comprobó por PCR que la construcción se había recombinado en el gen *ttsI*.

Posteriormente se comprobó por PCR que las cepas mutantes tenían un patrón de amplificación en la región del gen *ttsI* diferente del de la cepa parental.

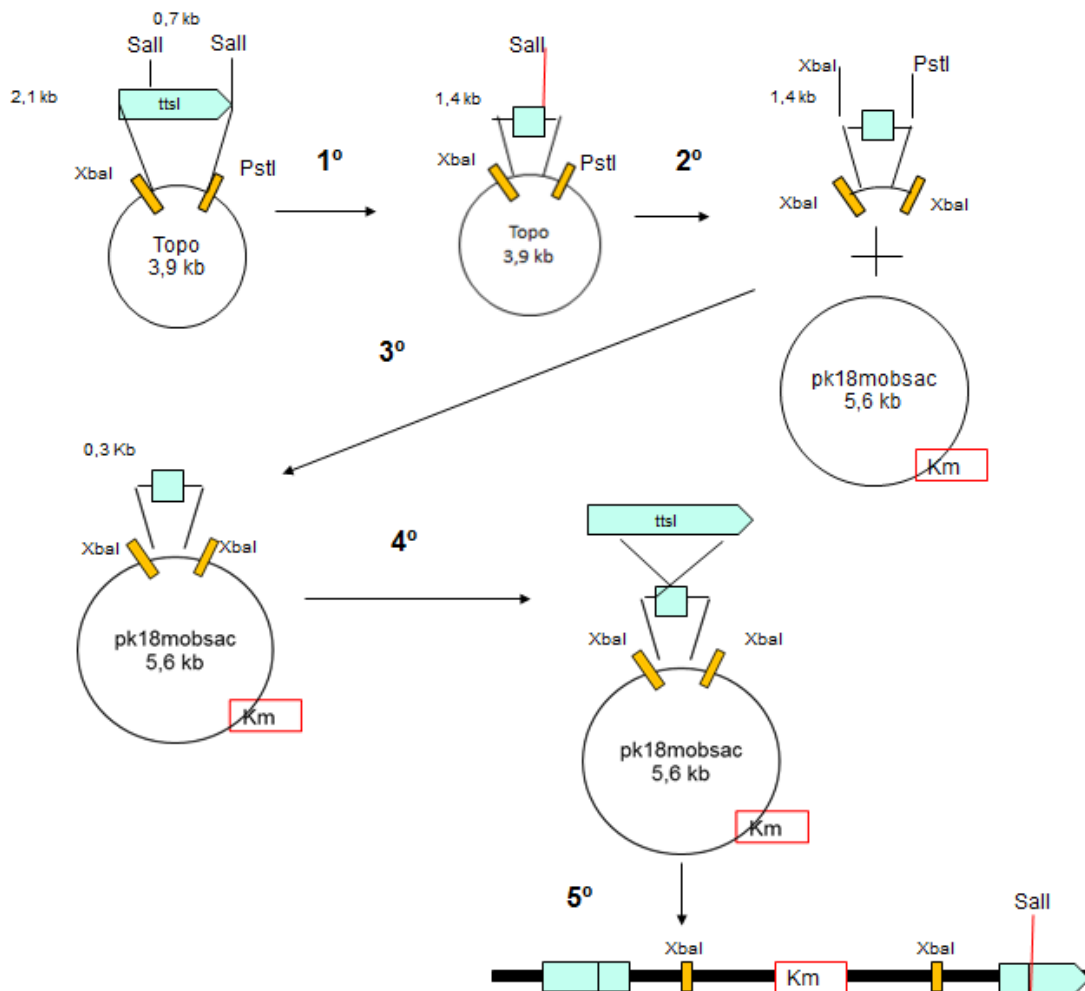


Fig. 6. Generación de una mutación en el gen *ttsI* de la cepa *B. sp* LmjC: 1º Digestión con la enzima de restricción *Sall* y extracción de la región 3' de 0,7 kb del gen *ttsI*. 2º Digestión con las enzimas de restricción *XbaI* y *PstI*. 3º Transferencia de  $\Delta ttsI$  en el vector "pk18mobsac". 4º y 5º Conjugación y recombinación simple en el genoma de LmjC.

### 16. Generación de mutaciones en los genes *impC1*, *impC2*, e *impO* de la cepa ISLU101

Para la inactivación de los genes *impC1*, *impC2*, *impO* e *impS1* indicados se forzó una recombinación con un región interna de cada gen. Las regiones internas se amplificaron por PCR con los cebadores presentados en la Tabla 3. Los tamaños de los fragmentos amplificados fueron aproximadamente de 500 pb y se clonaron en PCR2.1 TOPO y se transformaron células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ . A continuación los fragmentos internos de cada gen se clonaron en el vector pK18mobSacB mediante digestión con *EcoRI* como se muestra en la Figura 7. Después se pasaron las construcciones desde *E.coli* DH5 $\alpha$  a S17.1 y desde esta última se conjugaron a la cepa



## Material y Métodos

ISLU101. Posteriormente se comprobó por PCR que las cepas mutantes tenían un patrón de amplificación en la región del gen de interés diferente del de la cepa parental.

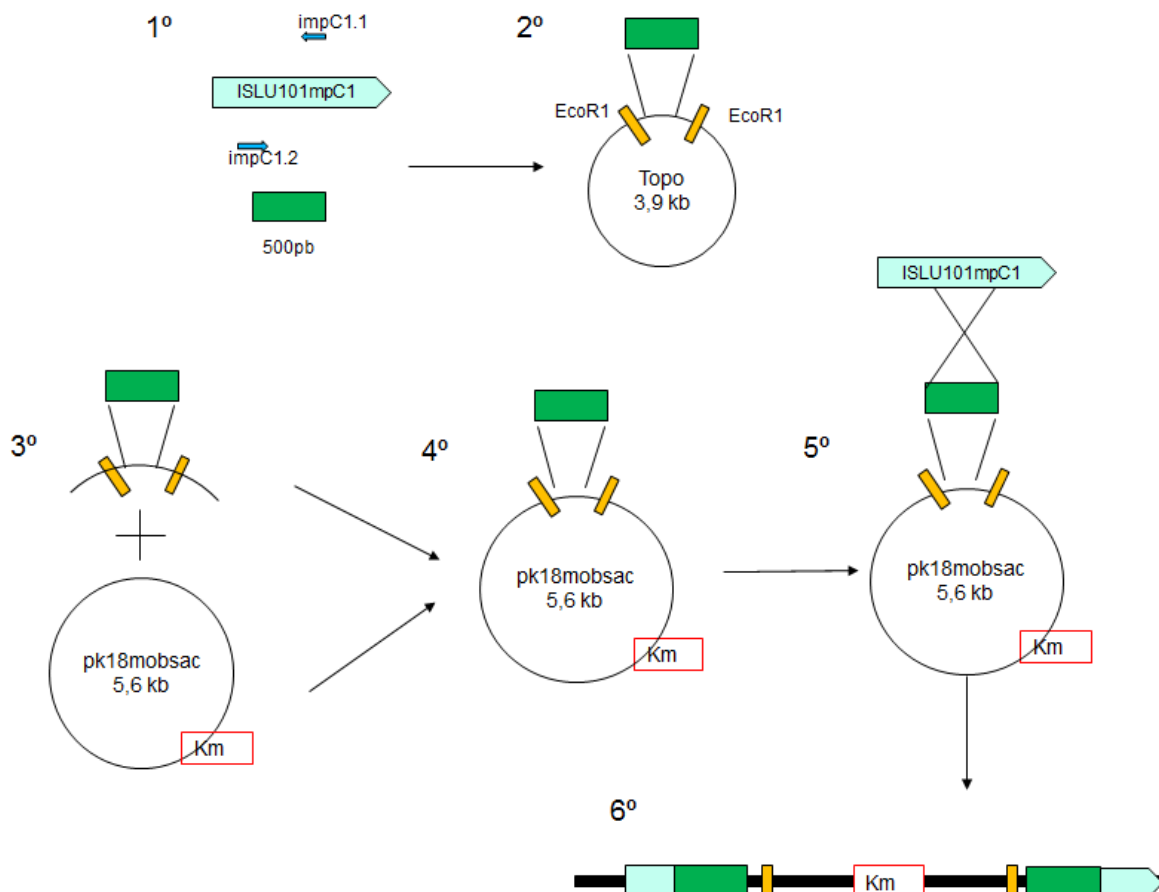


Figura 7. Generación de una mutación en el gen *impC1*. El mismo método se siguió para los genes *impC2*, *impS1* e *impO*. 1º Amplificación de la región génica interna de los genes (aproximadamente 500 pb) 2º Clonaje de la región interna amplificada en el vector PCR2.1 TOPO 3º y 4º Digestión con la enzima *EcoRI* y transferencia en el vector pK18mobsacB 5º y 6º Recombinación simple por conjugación en el genoma de *B. sp. ISLU101/B. japonicum* USDA110

### 17. Generación de mutaciones en los genes *impC*, *impO* e *impS* de la cepa USDA110

Al comparar las secuencias de los genes *impC1* e *impO* e *impS1* con las de otras bacterias se encontró una conservación superior 94% de nucleótidos idénticos respecto a *B. japonicum* USDA110. Esto permitió realizar la conjugación de los derivados de pK18mobSacB con las regiones internas de los genes mencionados y la cepa USDA 110, obteniéndose las correspondientes cepas mutantes. Posteriormente se comprobó por PCR que las cepas mutantes tenían un patrón de amplificación en la región del gen de interés diferente del de la cepa parental.

## Resultados

### 2.1 Filogenia de los SSTVI de *Bradyrhizobium* sp. ISLU101 y de otros bradyrhizobios

El SSTVI de *Rhizobium leguminosarum* RBL5523 impide la simbiosis efectiva con guisantes (Bladergroen et al., 2003) y es el único caso donde se ha estudiado el papel de estos genes en la simbiosis de rizobios. En otros rizobios sólo se han identificado los SSTVI por análisis de secuencias: *R. leguminosarum* 3841, *Azorhizobium caulinodans* ORS571, *Mesorhizobium loti* MAFF303099, *Cupriavidus taiwanensis* LMG19424 y *Methylobacterium nodulans* ORS2060 y la organización de sus SSTVI se presentan en la Figura 13 y se comparan con los dos SSTVI de la cepa ISLU101.

Existe un importante grado de conservación y los porcentajes de identidad de aminoácidos son al menos del 60%. Los porcentajes de identidad y similitud de cada gen de la cepa ISLU101 y otras cepas se presentan en la Tabla 8 del Anexo.

Con objeto de establecer la relación filogenética de los dos SSTVI de la cepa ISLU101 se ha realizado un árbol filogenético concatenando 11 proteínas (ImpA, ImpB,

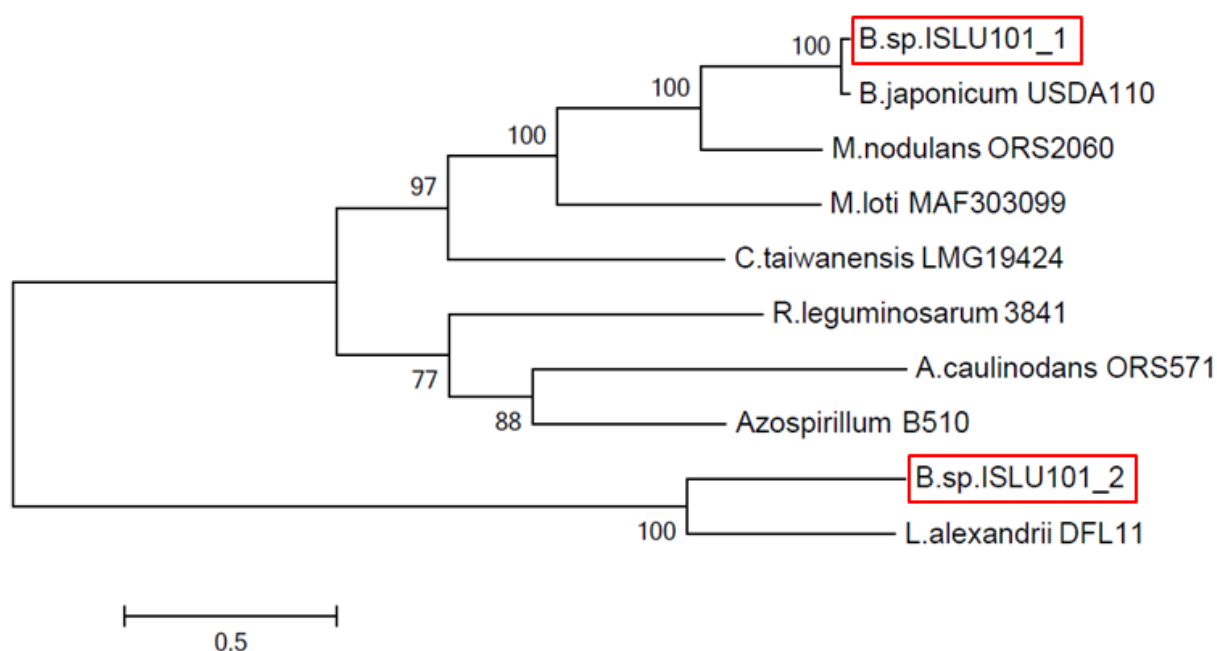


Fig.14. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en la concatenación de ImpA, ImpB, ImpC, ImpF, ImpH, ImpI, ImpJ, ImpK, ImpN, ImpO e ImpS de Bradyrhizobios. Con un recuadro se destacan la secuencias analizadas en este trabajo de la cepa ISLU101. El remuestreo aleatorio o bootstrapping (100 replicaciones) se muestra en los nodos de las ramificaciones. La barra horizontal indica la escala con el número de sustituciones por sitio.

ImpC, ImpF, ImpH, ImpI, ImpJ, ImpK, ImpN, ImpO e ImpS). El resultado presentado en la figura 14 indica que el SSTVI-1 se parece, como se ha mencionado, al de B.

## Resultados

*japonicum* USDA 110 y en menor medida al de *Methylobacterium nodulans*. el SSTVI-2 forma otra rama bastante alejada y se relaciona con el SSTVI de *Labrenzia alexandrii*.

### 2.2 Fenotipo simbiótico de mutantes en genes de los SSTVI de *B. sp.* ISLU101

Con objeto de conocer el papel de estos sistemas de secreción en la simbiosis se procedió a la generación de mutantes en los genes *impC1*, *impC2*, *impS1* e *impO* y se inocularon con plantas de *L. angustifolius*. La función propuesta para estos genes en base a estudios con genes ortólogos en otras bacterias (Silverman et al., 2012) se resume en la Fig.7, donde el gen *impC* codifica para una proteína que forma parte de la envuelta de la estructura de secreción, *impS* es el elemento de punción e *impO* (sólo en el SSTVI-1) codifica para una ATPasa implicada en el reciclaje del SSTVI y actuaría como hexámero. La obtención del mutante *impS1* se obtuvo al final y no se han realizado los ensayos de inoculación con *L. angustifolius*, sin embargo si se pudo probar el mutante en este gen en la cepa USDA 110 como se presenta en el apartado 3.

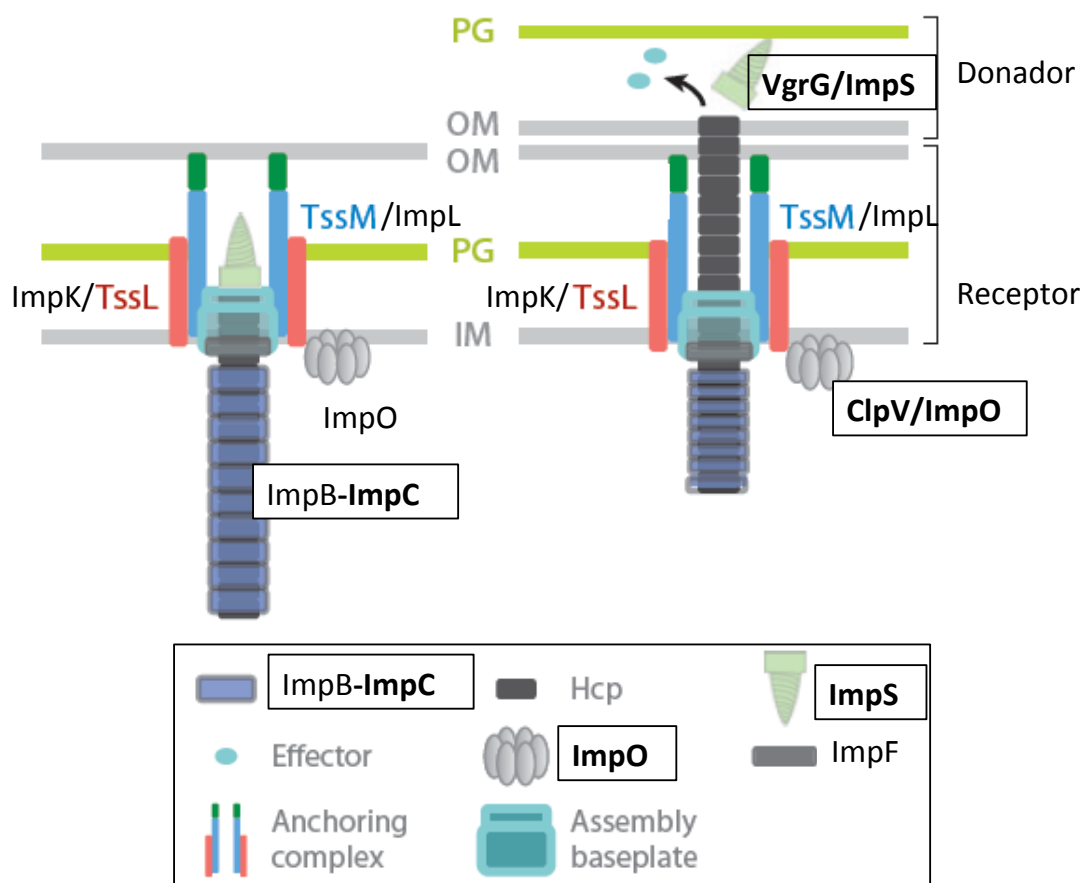


Fig. 15. Estructura de un SSTVI según Silverman et al., 2012. En negrita dentro de un recuadro se indican las proteínas cuyos genes se han mutado en este trabajo: *impC*, *impS* e *impO*.

## Resultados

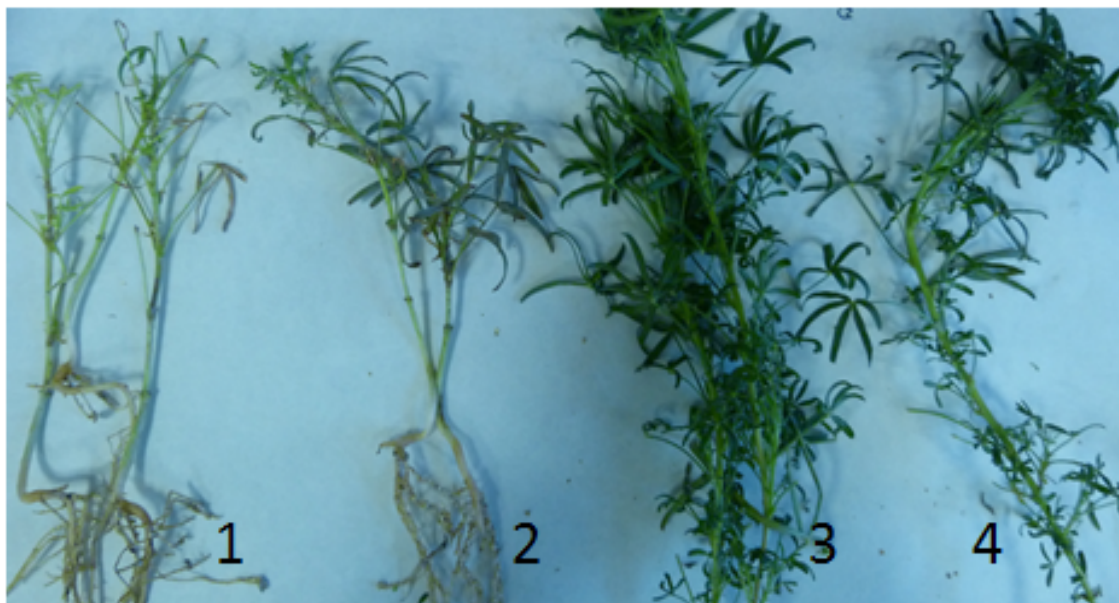
---

El aspecto de las plantas tras 40 días de la inoculación con la cepa ISLU101 y los mutantes se presenta en la Figura 9 y se observó que el porte de las plantas inoculadas con la cepa ISLU101, ISLU101impC1 e ISLU101impC2 era similar, sin embargo el porte de las plantas inoculadas con ISLU101impO era claramente menor. El peso promedio las plantas de tres ensayos independientes se recogen en la Fig. 10 donde se muestra el menor peso de las plantas inoculadas con el mutante impO. Todas las plantas inoculadas presentaron nódulos pero el aspecto de los nódulos producidos por el mutante ISLU101impO era diferente, se encontraron nódulos variados: blancos y rojizos y de distinto tamaño (ver Fig.17A). Además los nódulos producidos por la cepa impO aparecieron dispersos en la raíz principal y en raíces secundarias mientras que los nódulos producidos por las demás cepas, se acumulaban en la raíz principal de forma apretada (Fig. 17A). El peso de los nódulos se muestra en la figura 17 y no se observan grandes diferencias entre el mutante *impO* y la cepa parental, sin embargo la actividad nitrogenasa es claramente menor en la cepa mutante. Estos datos podrían explicarse por la aparición de nódulos blancos en las raíces de la planta infectada con la cepa mutante.

Los resultados obtenidos con la cepa *ImpC2* mostraron gran variabilidad en cuanto al número de nódulos y a la actividad nitrogenasa pero no parece que difieran significativamente de los valores en la cepa parental.

## Resultados

A.



B.

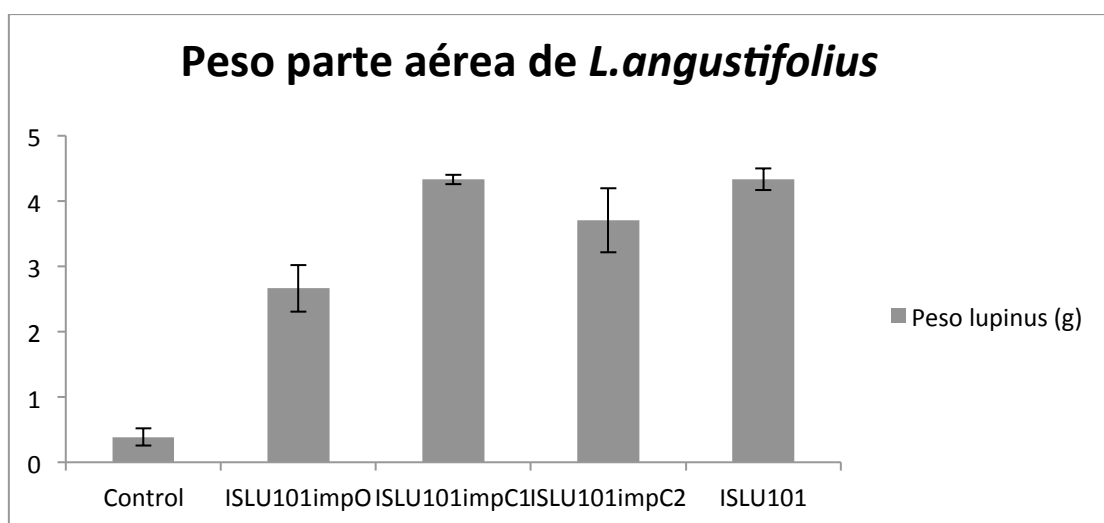
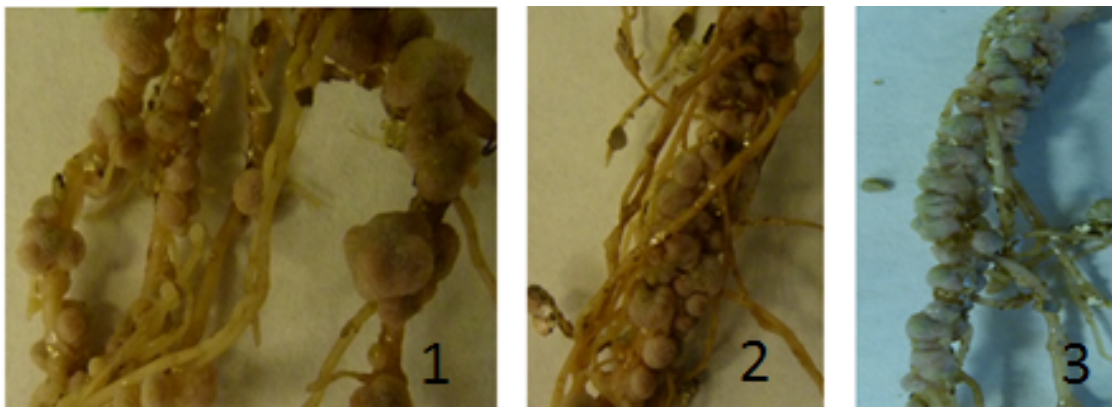


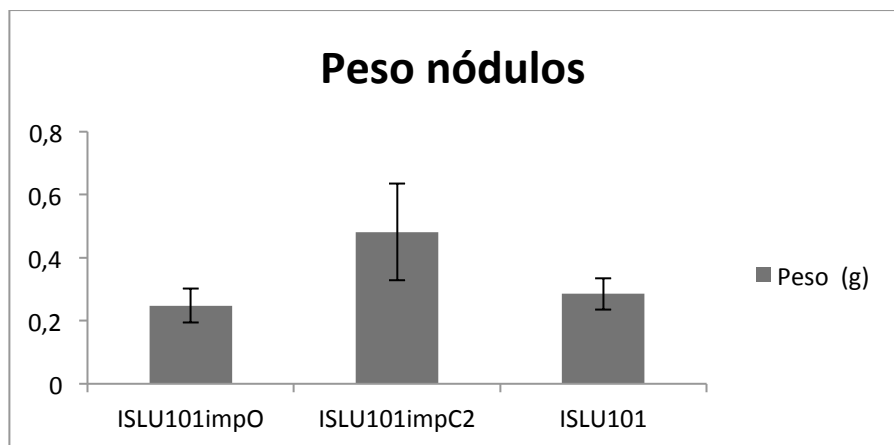
Fig. 16. Fenotipo y parte aérea de *L.angustifolius* **A.** Fenotipo de plantas de *L.angustifolius* tras 40 días de ser inoculadas. Desde la izquierda: planta sin inocular (1), inoculada con ISLU101impO (2), ISLU101C2 (3), ISLU101 (4). **B.** Peso de la parte aérea de plantas de *L. angustifolius* tras 40 días de ser inoculadas. Los resultados son medias de tres ensayos con tres plantas/ ensayo excepto para el mutante ISLU101impC1 del que sólo se ha realizado un ensayo.

## Resultados

A.



B.



C.

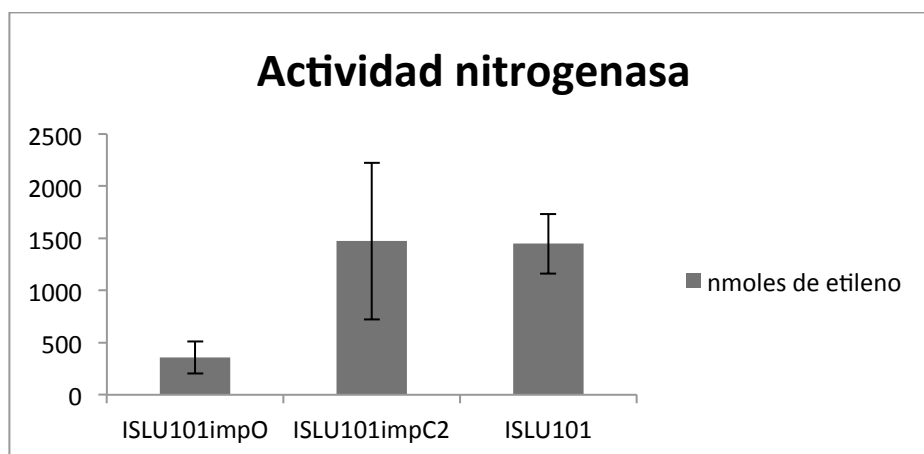


Fig. 17. Nódulos en *L.angustifolius* A. Aspecto de nódulos de plantas de *L. angustifolius* tras 40 días de ser inoculadas. Desde la izquierda inoculada con: ISLU101impO (1), ISLU101C2 (2), ISLU101 (3). B. Peso de los nódulos. C. Actividad nitrogenasa (reducción de acetileno) de los nódulos. Unidades: nmoles de etileno x  $\text{mg}^{-1}$  de peso fresco de nódulos x  $\text{h}^{-1}$ . Los resultados son medias de tres ensayos con tres plantas/ ensayo.

# Resultados

---

## 3. Sistema de secreción tipo VI en *Bradyrhizobium japonicum* USDA110

En el apartado anterior se ha mostrado que el SSTVI-1 de la cepa ISLU101 es muy parecido al de *B. japonicum* USDA110, en particular las proteínas codificadas por los genes *impC1*, *impS1* e *impO* presentan un 99, 98 y 96 % de aa idénticos respectivamente, ver Figs. 23, 25 y 27 del Anexo donde se presenta el alineamiento de dichas proteínas, por lo que las construcciones utilizadas para generar los mutantes en ISLU101 se emplearon en USDA110. Ese hecho unido a que la cepa USDA 110 contenga un sólo SSTVI y tenga un menor tiempo de generación motivó la construcción de las cepas USDA110impC, USDA110impS e USDA110impO. Además la simbiosis *Bradyrhizobium*-soja es una de las mejor estudiadas por la gran importancia económica que tiene esta planta en alimentación animal.

### 3.1. Ensayos con soja (*Glycine max*)

Las cepas USDA110impC, USDA110impS e USDA110impO se probaron con plantas de soja y los resultados se muestran en la Fig. 18. Se puede destacar que el mutante *impC* produce menos nódulos que se repartían de forma dispersa por la raíz principal y las secundarias y su aspecto fue ligeramente menos rojizo que en la cepa parental. El tamaño de los nódulos fue similar pero con menor actividad nitrogenasa y generó plantas de menor porte y con hojas de color verde más claro respecto a la cepa parental. Mutaciones en *impO* parecen tener un ligero efecto negativo en el vigor de las plantas de soja, pero los datos corresponden a un solo ensayo. Respecto a la mutación en *impS* se obtuvieron dos plantas en distintos tiestos con aspecto diferente lo que justifica la gran desviación estándar de los resultados. Los valores medios son comparables a los de la cepa parental.

## Resultados

A



B

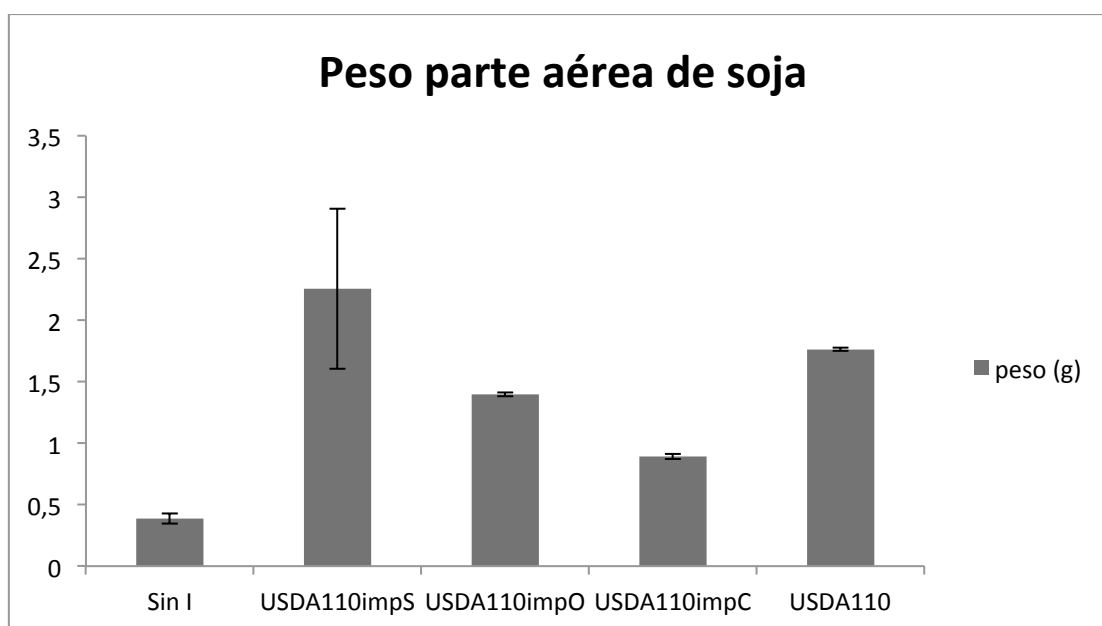
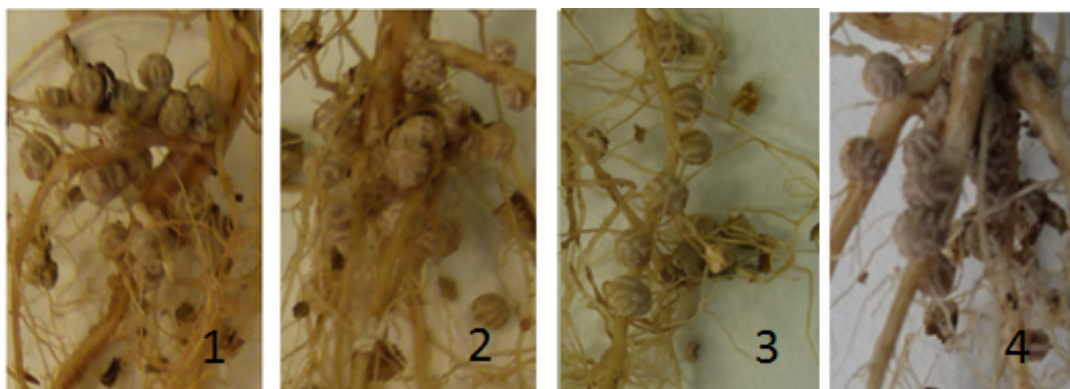


Fig. 18. Fenotipo y parte aérea de *Glycine max* **A.** Fenotipo de plantas de *Glycine max* tras 40 días de ser inoculadas. Desde la izquierda: planta sin inocular (1), inoculada con USDA110impS (2), USDA110impO (3), USDA110impC (4), USDA110 (5) **B.** Peso de la parte aérea de las mismas plantas. Los resultados son medias de un ensayo con dos plantas.

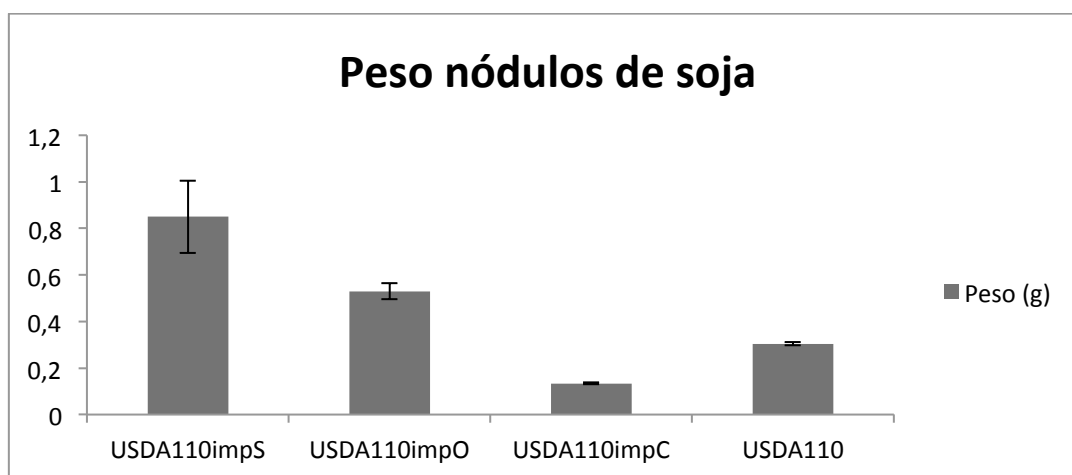


## Resultados

A



B



C

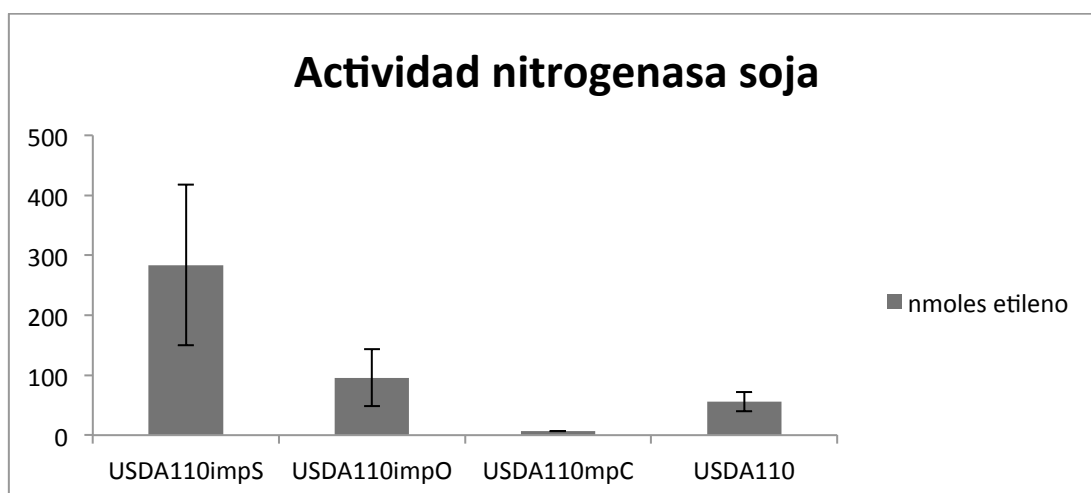


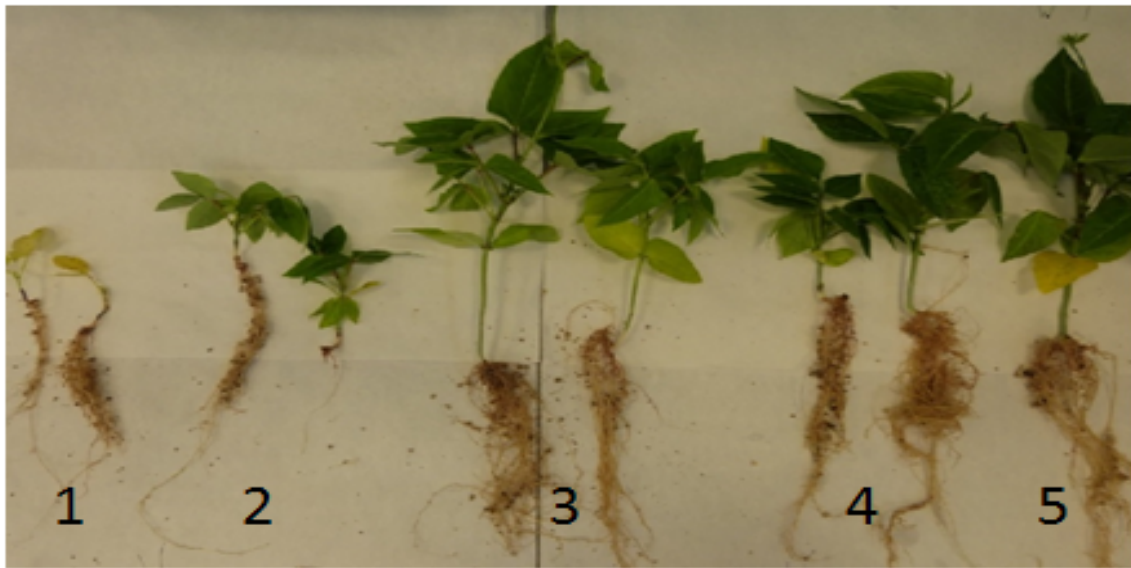
Fig. 19. Nódulos en *Glycine max* A. Aspecto de nódulos de plantas de *Glycine max* tras 40 días de ser inoculadas. Desde la izquierda inoculada con USDA110impS (1), USDA110impO (2), USDA110impC (3), USDA110 (4). B. Peso de los nódulos. C. Actividad nitrogenasa (reducción de acetileno) de los nódulos. Unidades: nmoles de etileno  $\times$   $\text{mg}^{-1}$  de peso fresco de nódulos  $\times$   $\text{h}^{-1}$ . Los resultados son la media de un ensayo con dos plantas.

# Resultados

## 3.2. Ensayos con caupí (*Vigna unguiculata*)

Las cepas USDA110impC, USDA110impS e USDA110impO se probaron también en el mismo ensayo con plantas de caupí. Los resultados aparecen en la Fig. 20. La nodulación por la cepa parental y por los mutantes en los genes *impC*, *impO* fue similar aunque se registró una menor actividad nitrogenasa en los mutantes. Donde se encontró un efecto claro fue en las plantas inoculadas con el mutante impS. Los nódulos fueron mucho más escasos y con menor actividad nitrogenasa lo que se reflejó en unas plantas de menor porte como se ve en la Fig. 21.

A



B

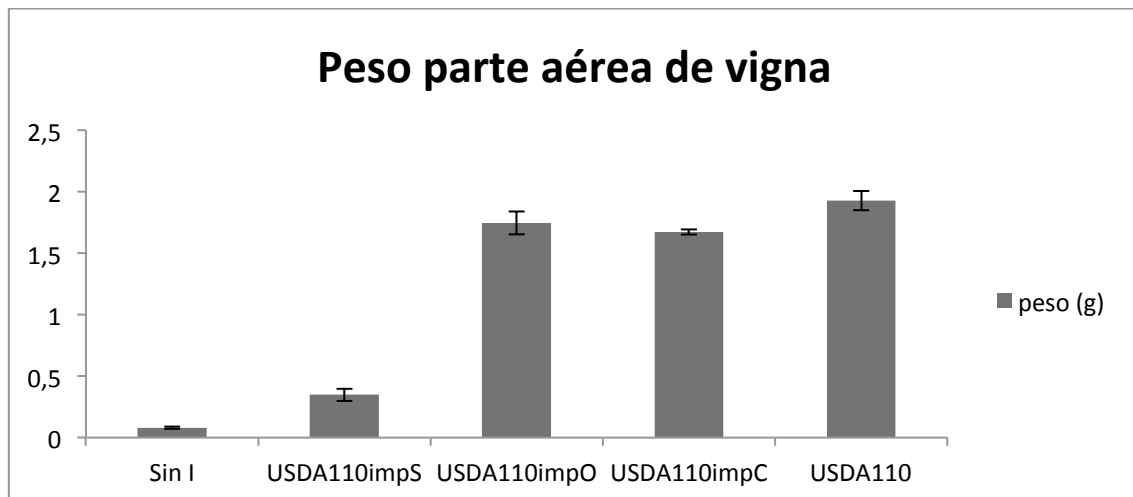
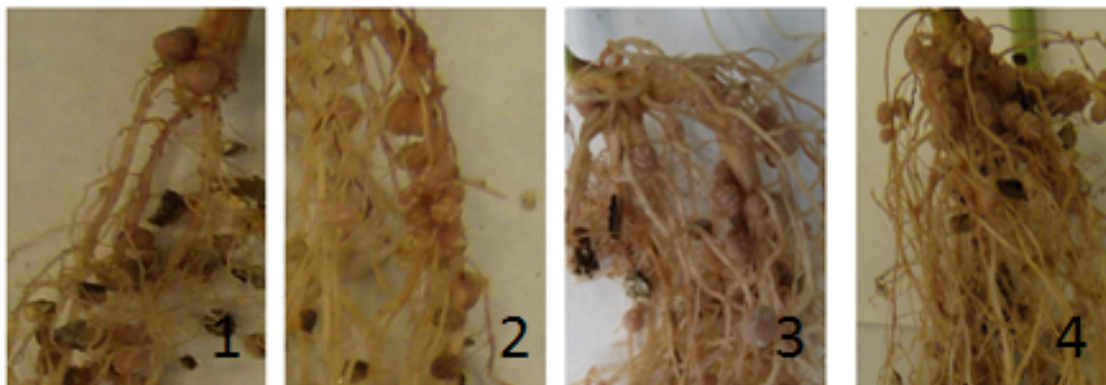


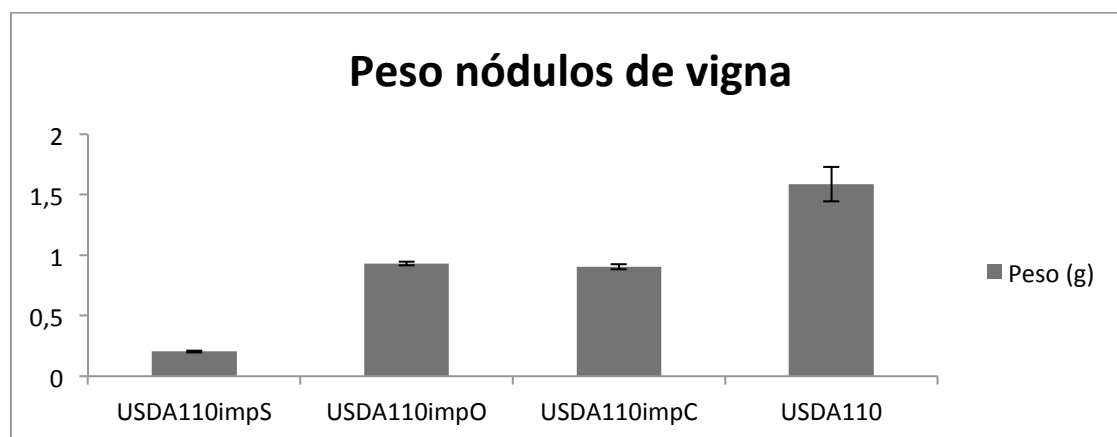
Fig. 20. Fenotipo y parte aérea de *Vigna unguiculata* A Fenotipo de plantas de *V. unguiculata* tras 40 días de ser inoculadas. Desde la izquierda: planta sin inocular (1), inoculada con USDA110impS (2), USDA110impO (3), USDA110impC(4), USDA110 (5) B. Peso de la parte aérea de las mismas plantas. Los resultados son medias de un ensayo con dos plantas.

## Resultados

A



B



C

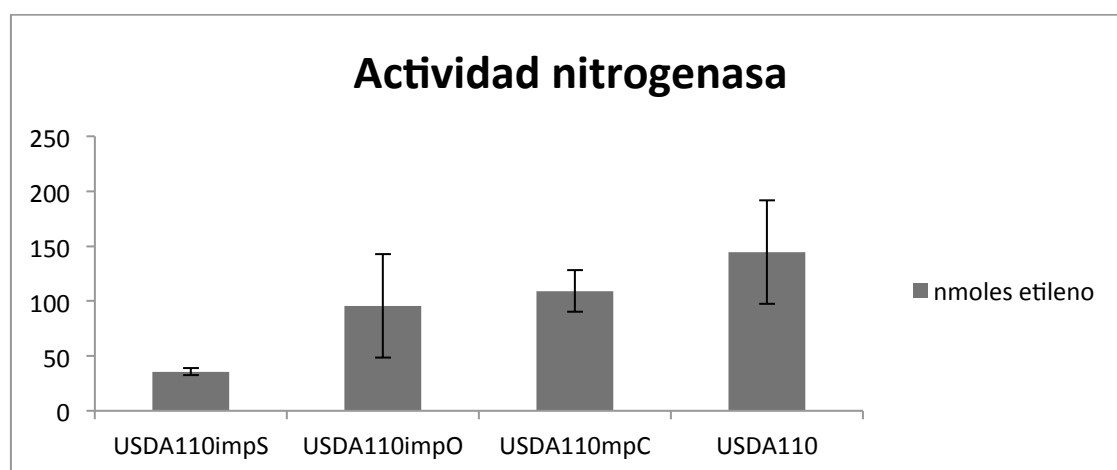


Fig. 21. Nódulos en *Vigna unguiculata* A. Aspecto de nódulos de plantas de *Vigna unguiculata* tras 40 días de ser inoculadas. Desde la izquierda inoculada con USDA110impS (1), USDA110impO (2), USDA110impC (3), USDA110 (4). B. Peso de los nódulos. C. Actividad nitrogenasa (reducción de acetileno) de los nódulos. Unidades: nmoles de etileno x  $\text{mg}^{-1}$  de peso fresco de nódulos x  $\text{h}^{-1}$ . Los resultados son medias de tres ensayos con tres plantas/ensayo.



## Resultados

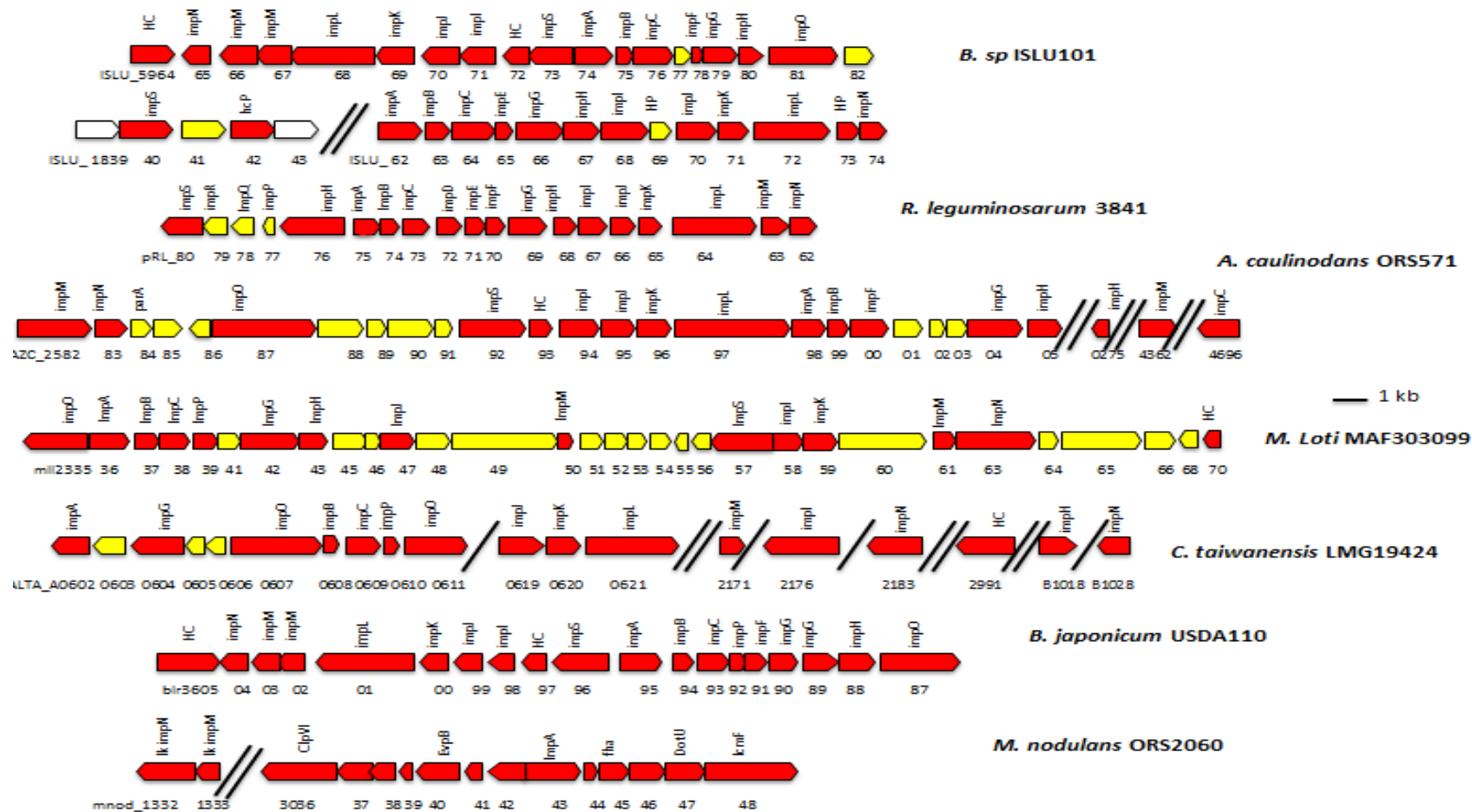


Fig.13. Organización génica y comparación de los dos SSTVI de *B. sp. ISLU101* y otros *Bradyrhizobium*. La orientación y tamaño de los genes se muestra con flechas. En rojo se indican genes conservados al menos en tres cepas, en amarillo los específicos de cada bacteria y en blanco los relacionados con transposición.

## **DISCUSIÓN**

En los rizobios se han identificado tres sistemas de transporte (Tipo III, IV y VI) descritos como capaces de inyectar, en un sólo paso, proteínas llamadas efectores en el interior de células eucarióticas desde el citoplasma bacteriano. Una bacteria determinada puede expresar uno o más tipos de estos sistemas. El de tipo IV puede transportar proteínas pero transporta principalmente ADN. El de tipo III es el mejor estudiado en rizobios y su presencia puede ser esencial para la simbiosis. La importancia simbiótica del tipo VI sólo se ha descrito como sistema que dificulta formación de nódulos efectivos en guisante por la cepa de *R. leguminosarum* RBL5523 (Bladergroen et al., 2013). En este Trabajo se ha estudiado el SSTIII en la cepa LmjC, y el SSTVI de las cepas ISLU101 (dos SSTVI) y USDA110. La cepa USDA 110 posee además un SSTIII bien caracterizado por el grupo del Dr. Michael Göttfert, Universidad de Dresde, Alemania y no ha sido objeto de estudio en este Trabajo.

### **1. El SSTIII de *Bradyrhizobium* sp. LmjC**

La cepa LmjC se incluye en el género *Bradyrhizobium* y filogenéticamente está asociado a otras cepas con un crecimiento extraordinariamente lento, y está próxima a las especies de *B. jicamae*, *B. lablabi* y *B. retamae* (Durán et al., 2013; Guerrouj et al., 2013).

En primer lugar, para analizar la relación del SSTIII de LmjC con el de otros sistemas de rizobios, se eligió el gen *ttsI* que es un activador transcripcional responsable de la expresión de varios genes del sistema y que está presente en todos SSTIII de rizobios identificados hasta el momento. En el análisis se han incluido varios *ttsI* identificados en este trabajo a partir de las secuencias genómicas de varias cepas de trabajo de nuestro laboratorio y que se resumen en la Tabla 2. Los resultados muestran que el gen *ttsI* de LmjC forma un grupo claramente aparte del resto de *ttsI* de otros rizobios. Sólo se agrupa con otros rizobios aislados de nódulos de *L. mariae-josephae* (cepas Lmj; LmjG2.10, LmjM1, LmjM3) y de una cepa aislada de nódulos de *Retama sphaerocarpa* RSB6. Esta última cepa es también una cepa de crecimiento extraordinariamente lento y con otras características comunes con las cepas de cepas Lmj. Cabe destacar que a raíz de este estudio se ha puesto de manifiesto que algunas cepas Lmj y la cepa RSB6 tienen dos genes *ttsI*. Cada *ttsI*, según datos preliminares no presentados, está asociado a un SSTIII y por tanto las cepas de LmjG2.10, LmjM1, LmjM3 y RSB6 tienen dos SSTIII y los primeros datos indican que uno de ellos es parecido al de *B. japonicum*

USDA 110 y el otro al de LmjC. A partir de la Fig. 9 se observa que el gen *ttsI* se distribuye en dos grupos, uno que incluye a LmjC y otro, a otras cepas Lmj y el resto de rizobios de varios géneros además de *Bradyrhizobium* como *Sinorhizobium* y *Mesorrhizobium*.

Las proteínas codificadas por *ttsI* del grupo de LmjC comparten entre ellos un porcentaje de identidad de aa superior al 80% y los mismo ocurre entre las cepas del otro grupo (> 85%). Si se compara los dos grupos, la conservación está por debajo del 50%.

Estos resultados apuntan a que los SSTIII tienen dos orígenes distintos en los rizobios estudiados hasta el momento. Apoyando esta hipótesis se encuentra el hecho de que comparando diferentes SSTIII, salvando los genes estructurales, los otros genes de la cepa LmjC no tienen ningún parecido con los genes no estructurales de otras cepas (Fig1; Lopez Ayala, 2011).

El producto del gen *ttsI* se une a unas secuencias denominadas cajas *tts* y activa diferentes genes relacionados con el SSTIII. También se han descrito estas cajas controlando otros genes. Dichas cajas están conservadas entre todos los rizobios que poseen T3SS (ver Bolzan de Campos et al., 2011). En este trabajo se han identificado 4 cajas en la agrupación del SSTIII, dos de ellas enfrentadas a los genes adyacentes y otras 5 en otros genes. El posible papel de las cajas en genes no relacionados con el SSTIII se desconoce.

### **1.1 Importancia del SSTIII en la simbiosis de LmjC-*L. mariae-josephae***

Con objeto de estudiar la importancia del SSTIII en la simbiosis de LmjC-*L. mariae-josephae*, se generó un mutante en el gen *ttsI*, que se había demostrado esencial para la expresión de diferentes SSTIII de bacterias como *S. fredii* (Bolzan de Campos et al., 2011) y *B. japonicum* (Krause et al., 2002). La cepa LmjCttsI mostró un interesante fenotipo ya que produjo nódulos blancos sin actividad nitrogenasa medida por el ensayo de reducción de acetileno. Como cabría esperar las plantas con nódulos no fijadores mostraron un color amarillento y con un menor porte respecto a la cepa parental. El papel del SSTIII es inyectar efectores, frecuentemente llamados proteínas Nop (nodulation outer protein) en rizobios, que ejercen un papel positivo, negativo o neutro al interactuar con otras proteínas en el citoplasma de la leguminosa hospedadora



(Deakin and Broughton, 2009). En la simbiosis de LmjC-*L. mariae-josephae*, el SSTIII parece jugar un papel esencial para los nódulos sean efectivos.

En estos momentos desconocemos cuales serían esos efectores, que en LmjC deberían tener un papel positivo para la simbiosis, aunque se han propuesto algunos candidatos entre las proteínas no conservadas codificadas por la agrupación del SSTIII (López Ayala, 2011).

Estos resultados abren la vía de estudio de la simbiosis de la cepa LmjCttsI con otras leguminosas. Sería interesante conocer si la eliminación del SSTIII podría tener un efecto beneficioso en simbiosis que ahora conocemos que son defectivas con la cepa parental. Es el caso de la inoculación de LmjC con *L. angustifolius* que produce muy pocos nódulos blanquecinos e inefectivos (Sánchez-Cañizares, 2011).

## **2. Los SSTVI de *B. sp.* ISLU101**

Entre los sistemas de secreción que pueden permitir a los rizobios inyectar proteínas al citoplasma de células de la leguminosa con la que interactúan, el de tipo VI es un gran desconocido. La cepa de *R. leguminosarum* RBL5523 es capaz de nodular *Vicia sativa* pero produce nódulos inefectivos en *Pisum sativum* (guisantes). En el año 2003 se describieron varios genes de *R. leguminosarum* RBL5523 que al ser mutados favorecían la nodulación efectiva con guisantes y a estos genes se les denominó genes *imp* (*impaired in nitrogen fixation*), en esos momentos se desconocía la posible función de dichos genes, aunque se encontró similitud significativa con genes presentes en *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae* y *Edwardsiella ictaluri* (Bladergroen et al., 2003). En 2006 se publicaron dos trabajos en los que los genes homólogos a los *imp* de *Vibrio cholerae* y *Pseudomonas aeruginosa* codificaban para un nuevo sistema de secreción de proteínas que se denominó de tipo VI (ver revisión de Silverman et al., 2012). Desde entonces, sólo se ha mencionado este sistema en rizobios en base a datos de secuencia (Bingle et al., 2008; Filloux et al., 2008; Boyer et al., 2009).

En base a datos de secuencia se han descrito dos SSTVI en la cepa ISLU101. El denominado SSTVI-1 es muy similar al que contiene *B. japonicum* USDA110, existe más de un 90% de similitud de aa entre las diferentes proteínas codificadas por ambos sistemas de secreción. El SSTVI-2 no parece estar relacionado con los SSTVI de rizobios descritos hasta el momento, ninguna proteína comparte más de un 40% de identidad con las proteínas de rizobios y formaría un grupo aparte. El SSTVI más

parecido es el de *Labrenzia alexandrii* DFL11 con el que conserva entre 40-72 % para algunos productos génicos. En este trabajo también se han identificado tres nuevos genes que formarían parte del SSTVI-III y que en estos momentos no sabemos si están contiguos al resto puesto que pertenecen a fragmentos de ADN distintos del genoma disponible. El hecho de que estos tres genes tengan una alta conservación con genes de *Labrenzia* hace plausible que estuvieran próximos.

La presencia de varias SSTVI en la misma bacteria no es extraño y en algunas cepas de *Pseudomonas* se han llegado a contabilizar 6 SSTVI como en *Yersinia pestis* y *Burkholderia pseudomallei* (Boyer et al., 2009).

Comparando los genes que comprenden los dos SSTVI de ISLU101 encontramos que, aunque sin gran similitud, se encuentran genes homólogos en ambas agrupaciones. Una excepción es el gen *impO* que codificaría para una ATPasa que actuaría en el reciclado de la nanoestructura de transporte y sólo se encuentra en el SSTVI-1.

Para analizar el papel de los SSTVI en la simbiosis se realizaron diferentes mutantes por recombinación simple y se obtuvieron las cepas ISLU101impC1, ISLU101impC2, ISLU101impO. Se inocularon plantas de *L. angustifolius* y los resultados han revelado que cuando se utilizó la cepa con gen *impO* mutado, el peso de las plantas es un 40% menor que cuando se inocula con la cepa parental. Los mismos resultados se han obtenido en tres ensayos independientes. Sin embargo los mutantes en los genes *impC1* e *impC2* no se tradujeron en diferencias con la cepa parental. Podría especularse con una función similar de ambos genes de forma que las mutaciones sencillas no tuvieran fenotipo o que tal vez este gen no fuera importante para la simbiosis. Las proteínas ImpC son elementos estructurales importantes ya que forman la envuelta de la nanojeringa. A la vista de estos datos podemos pensar en un papel positivo del SSTVI en la simbiosis ISLU101-*L.angustifolius*. El papel específico se desconoce y podría incluir el transporte de efectores desconocidos.

### **3. El SSTVI de *B. japonicum* USDA110**

El parecido entre los SSTVI de las cepas USD110 e ISLU101 permitieron también explorar el papel del SSTVI de la cepa USDA110 en la simbiosis con soja y caupí. Se obtuvieron los mutantes en *impC*, *impS* e *impO* y se inocularon con las leguminosas mencionadas.

Los resultados con plantas de soja apuntan a que el comportamiento de la cepa parental y la de los mutantes en *impO* e *impS* es similar en simbiosis mientras que el del mutante en *impC* genera plantas más pequeñas, porque se han contado menos nódulos y con muy baja actividad nitrogenasa. De nuevo esto podría indicar un papel positivo del SSTVI de la cepa USDA 110 en la simbiosis, aunque se requieren nuevas repeticiones para confirmar los resultados. En un trabajo transcriptómico de la cepa USDA 110 en simbiosis se encontró que diferentes genes que forman parte del SSTVI se inducían hasta 12 veces en bacteroides de 21 días postinoculación respecto a su expresión en vida libre en aerobiosis, lo que indica un papel de estos genes en la simbiosis (Pessi et al 2007), ver tabla 7.

Tabla 7. Incremento en la expresión de genes del SSTVI de *B. japonicum* USDA 110 en simbiosis con soja frente a vida libre (tomado de Pessi et al., 2007)

Gen	<i>imP</i>	<i>impC</i>	<i>impB</i>	<i>impS</i>	<i>impI</i>	<i>impJ</i>
Expresión	4,2	6,5	10,4	12,1	3,7	2,7

Los resultados con plantas de caupí difieren de los obtenidos en soja. En este caso las cepas parental y mutantes en *impO* e *impC* no mostraron diferencias respecto a su capacidad simbiótica y sin embargo el mutante *impS* produjo plantas menos nódulos, con baja actividad nitrogenasa y en consecuencia plantas más pequeñas con un 25% del peso de las inoculadas con la cepa parental. El gen *impS*, también designado como *vgrG*, codifica para una proteína que se forma parte del sistema de punción del sistema de secreción. Además se ha postulado que esta proteína en algunos casos podría tener alguna interacción con alguna proteína de la célula diana ver Fig. 22. El papel de *ImpS/VgrG* en la cepa USDA 110 o en otros rizobios es por el momento desconocido.

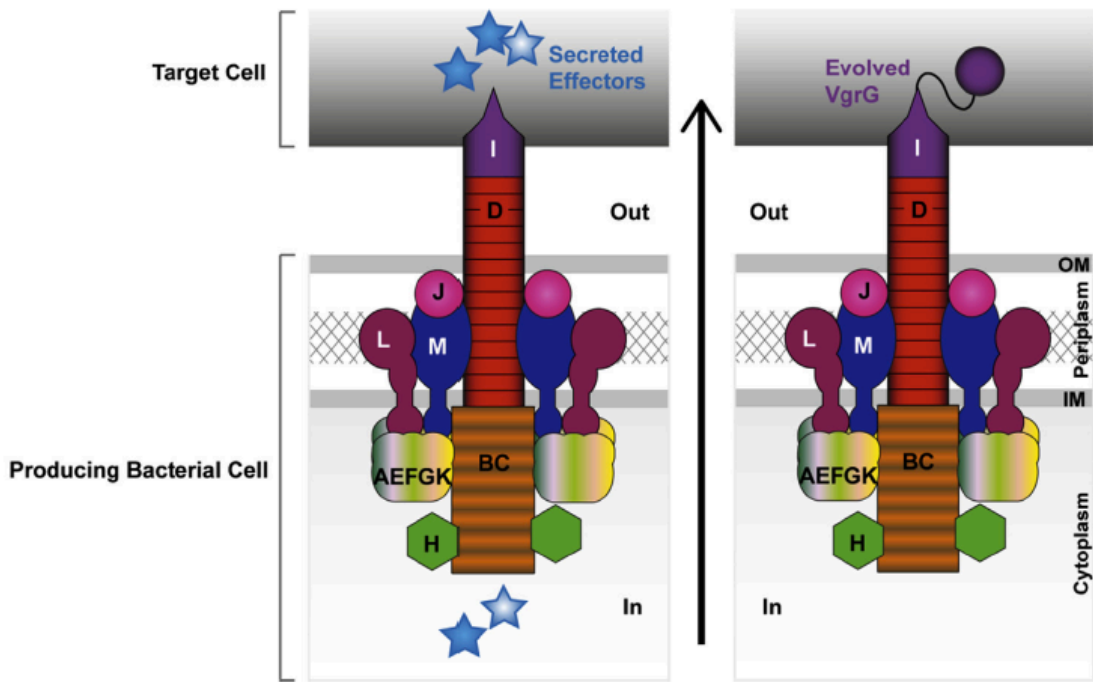


Fig. 22. Composición del SSTVI. A. Sistema que secreta proteínas efectoras. B. Sistema que utiliza ImpS/VgrG para interactuar con la célula diana. (Tomado de Coulthurst, 2013)

Este trabajo presenta datos de la importancia en la simbiosis de los sistemas de secreción de proteínas y muestra el potencial campo de estudio de los sistemas tipo III y VI en las simbiosis *Bradyrhizobium-Lupinus* y *Bradyrhizobium-soja*.

## **CONCLUSIONES**

- Se han identificación genes *ttsI* que forman parte de SSTIII en las siguientes cepas de *Bradyrhizobium*, las cepas Lmj y en otras cepas relacionadas secuenciadas en nuestro laboratorio.
- El análisis filogenético del activador transcripcional TtsI mostró dos grupos uno que incluye la cepa LmjC y otras cepas afines y otro donde se encuentran la mayoría de TtsIs de rizobios.
- El gen *ttsI* del SSTIII de la cepa LmjC es necesario para la nodulación efectiva con *L. mariae-josephae*. Un mutante *ttsI* produce nódulos blancos, Fix+
- El análisis filogenético de los dos SSTVI de *B. sp.* ISLU101 muestra que el SSTVI-1 se agrupa con los SSTVI de rizobios y el SSTVI es diferente y tiene como sistema más próximo el de un simbiote de protozoos llamando *Labrenzi.a*
- El gen *impO* del SSTVI-1 de la cepa ISLU101 es importante en la nodulación efectiva con *L. angustifolius*. Un mutante *impO* produce una mezcla de nódulos rojizos y blancos con menor actividad nitrogenasa y plantas de menor porte respecto a la cepa parental.
- Mutaciones independientes en *impC1* o *impC2* de los SSTVI de ISLU101 no parecen afectar la simbiosis con *L. angustifolius*.
- El gen *impC* del SSTVI de la cepa USDA110 parece importante en la nodulación efectiva con *Glycine max*. Un mutante *impC* produce menos nódulos con menor actividad nitrogenasa y plantas de menor porte respecto a la cepa parental.
- El gen *impS* del SSTVI de la cepa USDA110 parece importante en la nodulación efectiva con *Vigna unguiculata*. Un mutante *impS* produce menos nódulos con menor actividad nitrogenasa y plantas de menor porte respecto a la cepa parental.
- Mutaciones en *impO* o *impS* del SSTVI de la cepa USDA110 no parecen afectar la simbiosis con *G. max*.
- Mutaciones en *impO* o *impC* del SSTVI de la cepa USDA110 no parecen afectar la simbiosis con *V. unguiculata*.

## BIBLIOGRAFÍA

- Beuzón, C. Type III secretion and pathogenesis. (ref de 10 de marzo de 2013)  
Disponible en web: <http://webdeptos.uma.es/genetica/tipoiii/Research.html>
- Bingle, L., Bayley, M. and Pallen, M.J. Type VI secretion: a beginner's guide. *Current Opinion in Microbiology*, 2008, 11:3–8
- Bladergroen, M.R., Badelt, K and Spaink, H.P. Infection-blocking genes of a symbiotic *Rhizobium leguminosarum* strain that are involved in temperature-dependent protein secretion, *MPMI* Vol. 16, No. 1, 2003, pp. 53-64.
- Boulila F, Depret G, Boulila A, Belhadi D, Benallaoua S, Laguerre G. Retama species growing in different ecological-climatic areas of northeastern Algeria have a narrow range of rhizobia that form a novel phylogenetic clade within the *Bradyrhizobium* genus. *Syst Appl Microbiol*. 2009 Jul;32(4):245-55.
- Boyer F, Fichant G, Berthod J, Vandenbrouck Y, Attree I. Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome wide in silico analysis: what can be learned from available microbial genomic resources? *BMC Genomics*. 2009 Mar 12;10:104.
- Broughton, W. J., Hanin, M.; Relic, B., Kopcińska, J., Golinowski, W., Simsek, S., Ojanen-Reuhs, T.; Reuhs, B., Marie, C., Kobayashi, H., Bordogna, B., Le Quéré, A., Jabbouri, S., Fellay, R., Perret, X. y Deakin, W. J. Flavonoid-inducible modifications to rhamnan O antigens are necessary for *Rhizobium* sp. Strain NGR234-legume symbioses. *J. Bacteriol*. 2006, vol. 188, p. 3654-3663
- Büttner, D. Protein export according to schedule: architecture, assembly, and regulation of type III secretion systems from Plant- and animal-pathogenic bacteria. 2012. *MMBR* 76:262-310
- Castroviejo, S. y Pascual, H. *Lupinus L.* In: Talavera, S. (eds). *Flora Ibérica* 7(1): 251-260
- Chang YL, Wang JY, Wang ET, Liu HC, Sui XH, Chen WX. *Bradyrhizobium lablabi* sp. nov., isolated from effective nodules of *Lablab purpureus* and *Arachis hypogaea*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2011 Oct;61(Pt 10):2496-502
- Coulthurst, SJ. The type VI secretion system- a widespread and versatile cell targeting system. *Research in Microbiology*. 2013. 164:640654
- Deakin, W.J., and Broughton, W.J. Symbiotic use of pathogenic strategies: rhizobial protein secretion systems. 2009. *Nat Rev Microbiol* 7: 312-320.
- Durán D, Rey L, Sánchez-Cañizares C, Navarro A, Imperial J, and Ruiz-Argüeso T. Genetic diversity of indigenous rhizobial symbionts of the *Lupinus mariae-josephae* endemism from alkaline-limed soils within its area of distribution in Eastern Spain. *Syst Appl Microbiol*, 2013, 36(2):128-36.
- FAO. FAOSTAT2010. (ref 22 de enero de 2013). <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>
- FAO. FAOSTAT2011. (ref. 22 de enero de 2013). Disponible en web: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>
- Filloux A, Hachani A, Bleves S. The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. *Microbiology*. 2008 Jun;154(Pt 6):1570-83
- Gonzalez-Pedrajo, B. and Dreyfus, G. Sistemas de secreción de proteínas en las bacterias Gram negativas: biogénesis flagelar y translocación de factores de virulencia. *Mensaje Bioquímico*, Dpto. Bioquímica, Fac. Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, 2003 Vol XXVII 45-46
- Guerrero, A. *Cultivos Herbáceos Extensivos*. Ed: Mundiprensa, 1998, pp 640-650



- Guerrouj K, Ruíz-Díez B, Chahboune R, Ramírez-Bahena MH, Abdelmoumen H Quiñones MA, El Idrissi MM, Velázquez E, Fernández-Pascual M, Bedmar EJ, Peix A. Definition of a novel symbiovar (sv. *retamae*) within *Bradyrhizobium retamae* sp. nov., nodulating *Retama sphaerocarpa* and *Retama monosperma*. *Syst Appl Microbiol*. 2013 Jun;36(4):218-23
- Holland, IB, The extraordinary diversity of bacterial protein secretion mechanisms. 2010 . *Methods Mol. Biol*, 619:1-20
- Hood RD, Singh P, Hsu F, Güvener T, Carl MA, Trinidad RR, Silverman JM, Ohlson BB, Hicks KG, Plemel RL, Li M, Schwarz S, Wang WY, Merz AJ, Goodlett DR, Mougous JD. A type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* targets a toxin to bacteria . *Cell Host Microbe*. 2010 Jan 21;7(1):25-37
- Kambara, K.; Ardisson, S.; Kobayashi, H.; Saad, M.M.; Schumpp, O.; Broughton, W.J.; Deakin, W.J. Rhizobia utilize pathogen-like effector proteins during symbiosis. *Mol. Microbiol*, 2009, 71, 92-106.
- Kaneko T, Maita S, Hirakawa H, Uchiike N, Minamisawa K, Watanabe A, Sato S. Complete Genome Sequence of the Soybean Symbiont *Bradyrhizobium japonicum* Strain USDA6T, *Gene*, 2011, 2, 763-787
- Kaneko, T.; Nakamura, Y.; Sato, S.; Minamisawa, K.; Uchiumi, T.; Sasamoto, S.; Watanabe, A.; Idesawa, K.; Iriguchi, M.; Kawashima, K.; et al.. Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Res.*, 2002, 9, 189-197.
- Krause, A., Doerfel, A., and Göttfert, M. Mutational and transcriptional analysis of the type III secretion system of *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol Plant Microbe Interact*, 2002, 15:1228–1235
- Krishnan, H.B., Lorio, L., Kim, W.S., Jiang, G., Kim, K.Y., DeBoer, M., and Pueppke, S.G. Extracellular proteins involved in soybean cultivar-specific nodulation are associated with pilus-like surface appendages and exported by a type III protein secretion system in *Sinorhizobium fredii* USDA257. *Mol Plant Microbe Interact*, 2003, 16:617–625.
- López Ayala, P. Identificación y análisis de genes implicados en sistemas de secreción, formación de factores Nod y captación de sideróforos de bradyrhizobia aislados de *Lupinus angustifolius* y *L. mariae-josephi*” . Trabajo Fin de Carrera. Departamento de Biotecnología, Universidad Politécnica de Madrid. Marzo 2011.
- Ministerio de Agricultura, Medio Ambiente y Alimentación. Anuario Estadístico 2011 MAGRAMA, 2011 p. 610
- Marie C, Deakin WJ, Ojanen-Reuhs T, Diallo E, Reuhs B, Broughton WJ, Perret X. TtsI, a key regulator of *Rhizobium* species NGR234 is required for type III-dependent protein secretion and synthesis of rhamnose-rich polysaccharides. *Mol Plant Microbe Interact*. 2004, 17: 958-66
- Missouri University of Science and Technology. (ref. 20 de enero de 2013). Disponible en página web: <http://web.mst.edu/~djwesten/Bj.html>
- Mornico D., Miché L., Béna G., Nouwen N., Verméglio A., Vallenet D., Smith A.A.T., Giraud E., Médigue C., Moulin L. Comparative genomics of *Aeschynomene* symbionts : insights into the ecological lifestyle of nod-independent photosynthetic Bradyrhizobia. *Genes*, 2012, 3: 35-61.
- Muñiz, M. Las leguminosas en la nutrición (ref. 2 de febrero de 2013). Disponible en web: [http://www.leguminosas.es/files/Las\\_Leguminosas\\_en\\_la\\_nutricion.pdf](http://www.leguminosas.es/files/Las_Leguminosas_en_la_nutricion.pdf)

- Pascual, H. *Lupinus mariae-josephi* (Fabaceae), nueva y sorprendente especial descubierta en España. Anales del Jardín Botánico de Madrid 2004. 61(1): 69-72
- Okazaki, S., Okabe, O., Higashi, M., Shimoda, Y., Sato, S., Tabata, S., Hashiguchi, M., Akashi, R., Göttfert, M. and Saeki, K. Identification and functional analysis of type III effector proteins in *Mesorhizobium loti*. MPMI Vol. 23, No 2, 2010, pp. 223-234
- Okazaki, S., Zehner, S., Hempel, J., Lang, K., and Göttfert, M. (2009) Genetic organization and functional analysis of the type III secretion system of *Bradyrhizobium elkanii*. FEMS Microbiol Lett 295: 88-95.
- Ormeño-Orrillo E, Vinuesa P, Zúñiga-Dávila D, Martínez-Romero E. Molecular diversity of native bradyrhizobia isolated from lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Peru. Syst Appl Microbiol. 2006 Apr;29(3):253-62.
- Pessi G, Ahrens CH, Rehrauer H, Lindemann A, Hauser F, Fischer HM, Hennecke H. Genome-wide transcript analysis of *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids in soybean root nodules. Mol Plant Microbe Interact. 2007 312(2):184-91
- Ramírez-Bahena MH, Peix A, Rivas R, Camacho M, Rodríguez-Navarro DN, Mateos PF, Martínez-Molina E, Willems A, Velázquez E. *Bradyrhizobium pachyrhizi* sp. nov. and *Bradyrhizobium jicamae* sp. nov., isolated from effective nodules of *Pachyrhizus erosus*. Int J Syst Evol Microbiol. 2009 Aug;59(Pt 8):1929-34.
- Rego, A.T., Chandran, V, and Waksman, G. Two-step and one-step secretion mechanisms in Gram-negative bacteria: contrasting the type IV secretion system and the chaperone-usher pathway of pilus biogenesis. Biochem.J., 2010, 425, 475-488
- Sánchez C, Iannino F, Deakin WJ, Ugalde RA, Lepek VC. Characterization of the *Mesorhizobium loti* MAFF303099 type-three protein secretion system. Mol Plant Microbe Interact, 2009, 22(5):519-28
- Sánchez-Cañizares C, Rey L, Durán D, Temprano F, Sánchez-Jiménez P, Navarro A, Polajnar M, Imperial J, Ruiz-Argüeso. Endosymbiotic bacteria nodulating a new endemic lupine *Lupinus mariae-josephi* from alkaline soils in Eastern Spain represent a new lineage within the *Bradyrhizobium* genus. Syst Appl Microbiol, 2011, 34(3):207-15.
- Schmutz J, Cannon SB, Schlueter J, Ma J, et al., Genome sequence of the palaeopolyploid soybean Nature. 2010 Jan 14;463(7278):178-83.. Erratum in: Nature. 2010 May 6;465(7294):120.
- Silverman JM, Brunet YR, Cascales E, Mougous JD. Structure and regulation of the type VI secretion system Annu Rev Microbiol. 2012;66:453-72.
- Tseng, T.T., Tyler, B.M., and Setubal C. BMC Microbiology 2009, 9 (Suppl1): S2 doi: 10.1186/1471-2180-9-S1-S2
- Tsukui T, Eda S, Kaneko T, Sato S, Okazaki S, Kakizaki-Chiba K, Itakura M, Mitsui H, Yamashita A, Terasawa K, Minamisawa K. The type III Secretion System of *Bradyrhizobium japonicum* USDA122 mediates symbiotic incompatibility with Rj2 soybean plants. Appl Environ Microbiol. 2013 Feb;79(3):1048-51
- Universidad Islas Baleares. Taxonomía *Lupinus angustifolius* (ref. enero 2013). Disponible en web: <http://herbarivirtual.uib.es/cas-uv/especie/6430.html>
- Universidad Pública de Navarra. Taxonomía lupinus. (ref. diciembre 2012) Disponible en web: [http://www.unavarra.es/servicio/herbario/leguminosas/html/Lupinus\\_L.htm](http://www.unavarra.es/servicio/herbario/leguminosas/html/Lupinus_L.htm)
- Universidad Politécnica de Valencia. Taxonomía fabáceas (ref. diciembre 2012). Disponible en web: <http://www.euita.upv.es/varios/biologia/Temas%20Angiospermas/R%C3%B3sidas/Leguminosas/Leguminosas.htm>

- Villalobos, Enrique. Fijación Simbiótica del nitrógeno. Ed: Universidad de Costa Rica, 2006, p. 3
- Vinardell, J.M., Ollero, F.J., Hidalgo, A., López-Baena, F.J., Medina, C., Ivanov-Vangelov, K., Parada, m., Madinabeitia, N., Espuny, M. et al. NodR regulates diverse symbiotic signals of *Sinorhizobium fredii* HH103. Mol Plant Microbe Interact, 2004, 17:676–685.
- Viprey, V., Del Greco, A., Golinowski, W., Broughton, W.J., and Perret, X. Symbiotic implications of type III protein secretion machinery in Rhizobium. Mol Microbiol, 1998, 28:1381–1389.
- Wassem R, Kobayashi H, Kambara K, Le Quéré A, Walker GC, Broughton WJ, Deakin WJ. TtsI regulates symbiotic genes in Rhizobium species NGR234 by binding to tts boxes. Mol Microbiol, 2008, 68(3):736-48
- Zehner, S., Schober, S., Wenzel, M., Lang, K. and Göttfert, M. Expression of the *Bradyrhizobium japonicum* type III secretion system in legume nodules and analysis of the associated tts box promoter. MPMI Vol. 21 No. 8, 2008, pp. 1087-1093
- Zheng J. and Leung, K.Y. Dissection of a type VI secretion system in *Edwardsiella tarda*. Molecular Microbiology, 2007 66(5), 1192–1206

ANEXO

Tabla 8. Conservación de proteínas del SSTVI-1 de la cepa ISLU101 con las de otras bacterias.

ISLU101	USDA110	Id	Pos	R.leguminosarum 3841	Id	Pos	A.caulinodans ORS 571	Id	Pos
ImpN	blr3604	94	100	pRL120462	36	51	AZC_2582	29	44,3
impM	blr3603	94	100	PrI120463	26	44	AZC_2583	32	46,8
impM	blr3602	95	100	PrI120463	28	41	AZC_4362	41	47,1
impL	blr3601	94	100	pRL120464	30	46	AZC_2597	27	43,2
impK	blr3600	94	100	pRL120465	34	49	AZC_2596	43	56,1
impJ	blr3599	96	100	pRL120466	35	56	AZC_2595	39	55
impI	blr3598	93	100	pRL120467	31	44	AZC_2594	39	57
HC	blr3597	96	100	RL2558	39	58	AZC_2593	33	44,7
impS	blr3596	93	100	pRL120480	34	51	AZC_2592	35	50,3
impA	blI3595	90	100	pRL120475	40	56	AZC_2598	51	64,1
impB	blI3594	95	100	pRL120474	45	56	AZC_2599	40	59,2
impC	blI3593	94	100	pRL120473	48	64	AZC_4696	48	63,4
impP	blI3592	95	100	pRL120477	22	52	AZC_0275	30	47,5
impF	blI3593	91	100	pRL120473	48	64	AZC_2600	48	63,4
impG	blI3590	91	100	pRL120469	31	47	AZC_2604	31	44,4
impH	blI3588	94	100	pRL120468	27	43	AZC_2605	30	43,8
impO	blr3587	92	100	pRL120476	49	64	AZC_2587	50	65,9

ISLU101	C. taiwaniensis	Id	Pos	M. loti 303099	Id	Pos	M.nodulans ORS2060	Id	Pos
impN	RALTA_A2183	30	48	mlr2363	55	75,3	mnod1332	60	77
impM	RALTA_A2171	40	56	mlr2361	50	64	mnod1333	51	68
impM	RALTA_B1028	23	40	mlr2350	27	44,4	mnod3049	95	43
impL	RALTA_A0621	30	46	mlr2360	60	86,7	mnod3048	49	63
impK	RALTA_A0620	33	49	mlr2359	42	60,8	mnod3047	53	65
impJ	RALTA_A0619	36	54	mlr2347	31	47,4	mnod3046	69	84
impI	RALTA_A2176	33	52	mlr2358	31	52	mnod3045	42	55
HC	RALTA_A2991	33	50	mlr2370	32	47	mnod3044	40	48
impS	RALTA_A0611	33	52	mll2357	36	54	mnod3043	49	67
impA	RALTA_A0602	26	41	mlr2336	38	54,1	mnod3040	43	57
impB	RALTA_A0608	51	66	mlr2337	44	64	mnod3041	73	85
impC	RALTA_A0609	62	77	mlr2338	52	70,2	mnod3040	80	90
impP	RALTA_A0610	53	69	mlr2339	29	44,8	mnod3031	58	72
impF	RALTA_A0609	62	77	mlr2338	52	70,2	mnod3039	53	67
impG	RALTA_A0604	31	47	mlr2342	29	45,9	mnod3038	62	77
impH	RALTA_B1018	31	45	mlr2343	35	50,2	mnod3037	61	74
impO	RALTA_A0607	52	67	mll2335	50	65	mnod3036	68	81

objeto de evidenciar las diferencias entre los dos SSTVI de la cepa ISLU101 se presentan varios alineamientos y árboles filogenéticos de las proteínas ImpC1, impC2, ImpS1, ImpS2 e ImpO, figuras 8-14

Los alineamientos muestran

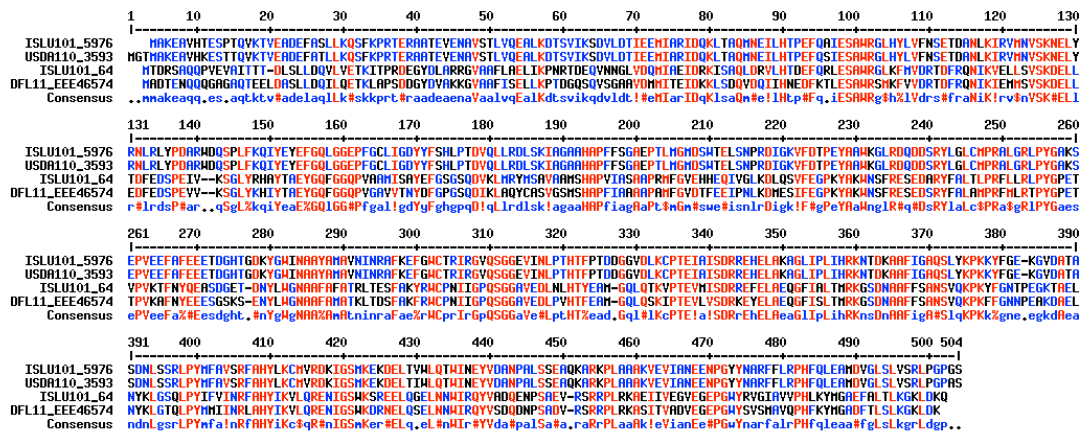


Fig. 23. Alineamiento de proteínas ImpC. En rojo se indican los aa conservados en todas las secuencias y en azul los conservados no en todas las secuencias. ISLU101 es una cepa de *Bradyrhizobium* sp.; USDA 110 de *B. japonicum* y DFL-11 de *Labrenzia alexandrii*

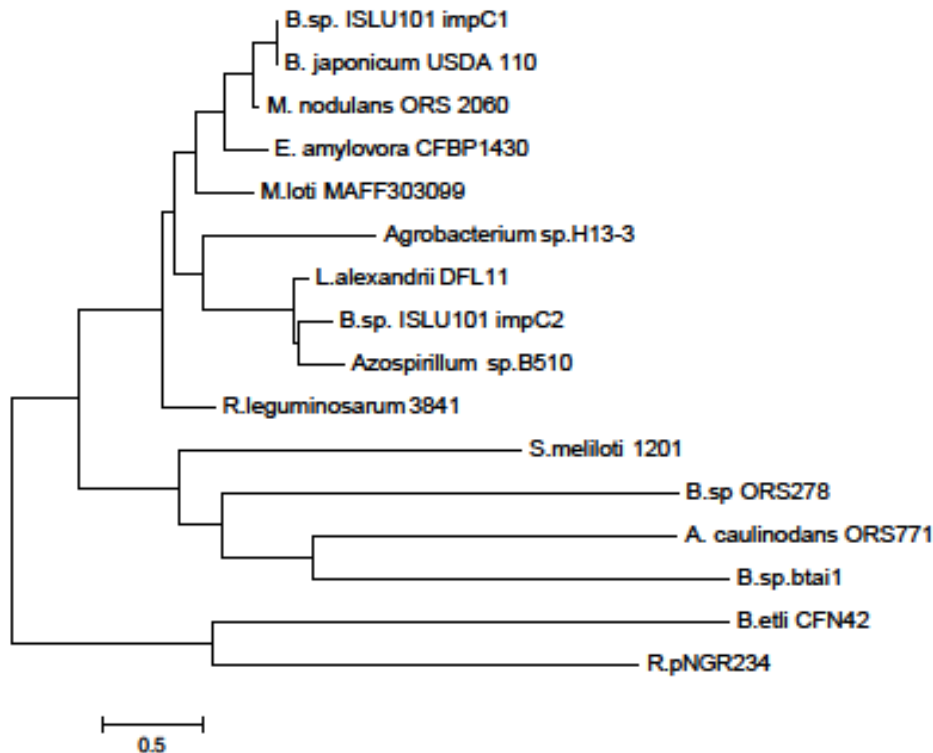


Fig.24 Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en la proteína ImpC de *Bradyrhizobios*. El remuestreo aleatorio o bootstrapping (1.000 replicaciones) se muestra en los nodos de las ramificaciones. La barra horizontal indica la escala con el número de sustituciones por sitio.

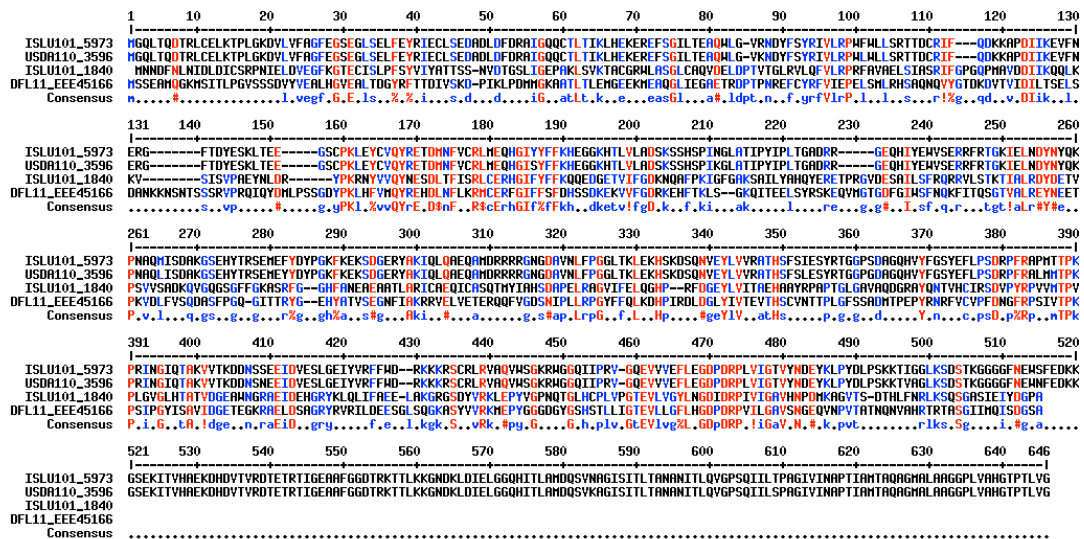


Fig. 25. Alineamiento de proteínas ImpS. En rojo se indican los aa conservados en todas las secuencias y en azul los conservados no en todas las secuencias. ISLU101 es una cepa de *Bradyrhizobium* sp.; USDA 110 de *B. japonicum* y DFL-11 de *Labrenzia alexandrii*

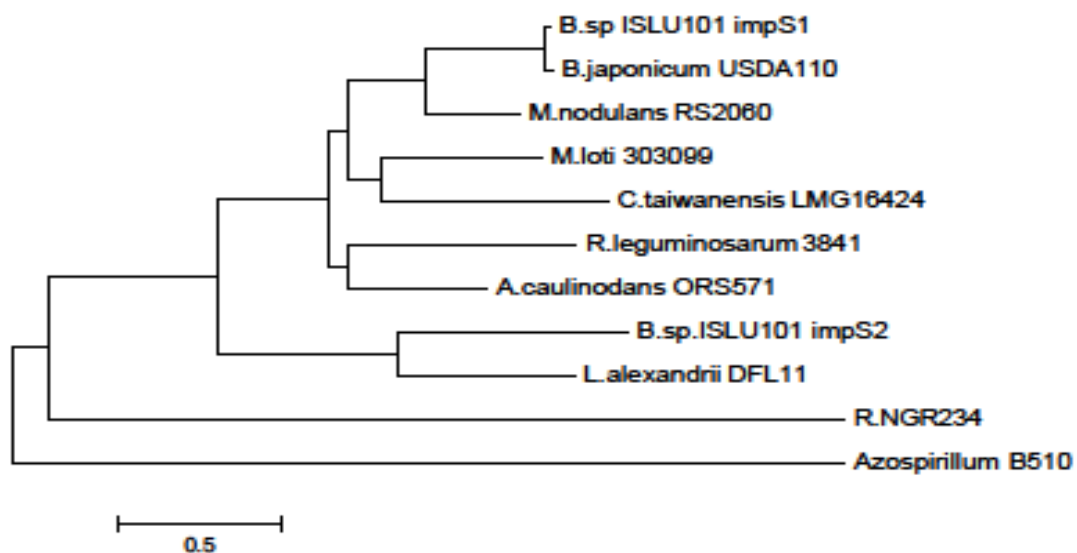


Fig. 26. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en la proteína ImpS de *Bradyrhizobios*. El remuestreo aleatorio o bootstrapping (1.000 replicaciones) se muestra en los nodos de las ramificaciones. La barra horizontal indica la escala con el número de sustituciones por sitio.

1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130

ISLU101\_5981 VTDTSEIARYTGKLNAGYDAFLQALRHAKSAGNRNVELAHHLFHILQQEGNDLSLVQHYKLDRAILLSDAGVTSFSGKNETDHPGVANSVIOLLORGHHAYTLFFGETQTRTGHLLYAGLKSNDIRRA  
b113587 MTDTSEIARYTGKLNAGYDAFLQALRHAKSAGNRNVELAHHLFHILQQEGNDLSLVQHYKLDRAILLSDAGVTSFSGKNETDHPGVANSVIOLLORGHHAYTLFFGETQTRTGHLLYAGLKSNDIRRT  
Consensus VTDTSEIARYTGKLNAGYDAFLQALRHAKSAGNRNVELAHHLFHILQQEGNDLSLVQHYKLDRAILLSDAGVTSFSGKNETDHPGVANSVIOLLORGHHAYTLFFGETQTRTGHLLYAGLKSNDIRRA

131 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260

ISLU101\_5981 LNNLSREFAKYNYVDLAAERRAYMTGSDEETNRPHDGSGLVGAGTEGAQAQGPKTTPLDRFSDQLTAKAKSGEHDPILGRDEETRLIDVLHRRQNNPILTGERGVGKTAVVEGFAQRIAGDVPVPL  
b113587 LNNLSREFAKYNYVDLAAERRAYMTGSDEETNRPHDGSGLVGAGTEGAQAQGPKTTPLDRFSDQLTAKAKSGEHDPILGRDEETRLIDVLHRRQNNPILTGERGVGKTAVVEGFAQRIAGDVPVPL  
Consensus LNNLSREFAKYNYVDLAAERRAYMTGSDEETNRPHDGSGLVGAGTEGAQAQGPKTTPLDRFSDQLTAKAKSGEHDPILGRDEETRLIDVLHRRQNNPILTGERGVGKTAVVEGFAQRIAGDVPVPL

261 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370 380 390

ISLU101\_5981 CSYPLCALDTGLMORGASHKGEFEQRLRSVIDEVQSSPTPIILFIDEAHTLIGAGGAGTGDAANLLKPPLARGTLRTIARTTAAEYRQYIEKOPALTRFQPTQIDEPQVETCCIMLRGLGPMEKHNG  
b113587 RGVRLCALDTGLMORGASHKGEFEQRLRSVIDEVQSSPTPIILFIDEAHTLIGAGGAGTGDAANLLKPPLARGTLRTIARTTAAEYRQYIEKOPALTRFQPTQIDEPQVETCCIMLRGLGPMEKHNG  
Consensus RGVRLCALDTGLMORGASHKGEFEQRLRSVIDEVQSSPTPIILFIDEAHTLIGAGGAGTGDAANLLKPPLARGTLRTIARTTAAEYRQYIEKOPALTRFQPTQIDEPQVETCCIMLRGLGPMEKHNG

391 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500 510 520

ISLU101\_5981 VRISDRAIVARVNLSHRYTPSRQLPKAVSLLOTASARVAISQSATPALIEDARVAIARRERSALVSDGLGIEDMERIVAIQNDIAHLKDKLTMLDGMHAYEQLKIDIRSIIEILSPFKEGEDPAA  
b113587 VRISDRAIVARVNLSHRYTPSRQLPKAVSLLOTASARVAISQSATPALIEDARVAIARRERSALVSDGLGIEDMERIVAIQNDIAHLKDKLTMLDGMHAYEQLKIDIRSIIEILSPFKEGEDPAA  
Consensus VRISDRAIVARVNLSHRYTPSRQLPKAVSLLOTASARVAISQSATPALIEDARVAIARRERSALVSDGLGIEDMERIVAIQNDIAHLKDKLTMLDGMHAYEQLKIDIRSIIEILSPFKEGEDPAA

521 530 540 550 560 570 580 590 600 610 620 630 640 650

ISLU101\_5981 RRRELKGFDTLETINPEKRVYVAVDQQSARVSVDATGIPVGRHARDEIETVLKPELNNRVVGSAGLTAIAKRIETSRKLDNPSKPIGVFHLAGPSGVGKTETALALACTLYGGEQNMITINNS  
b113587 RRRELKGFDTLETINPEKRVYVAVDQQSARVSVDATGIPVGRHARDEIETVLKPELNNRVVGSAGLTAIAKRIETSRKLDNPSKPIGVFHLAGPSGVGKTETALALACTLYGGEQNMITINNS  
Consensus RRRELKGFDTLETINPEKRVYVAVDQQSARVSVDATGIPVGRHARDEIETVLKPELNNRVVGSAGLTAIAKRIETSRKLDNPSKPIGVFHLAGPSGVGKTETALALACTLYGGEQNMITINNS

651 660 670 680 690 700 710 720 730 740 750 760 770 780

ISLU101\_5981 EFQEHTVSTLKGAPPYGVYGGGRLTEAVRRKPSVILLDEVEKAPDVHEIFFQVFDKGTEDGNGRRIDFKNTLITLTNVGTDRINGLSRDPKYRDEPEELAKHLPELLKVFPAALLGRIVSIP  
b113587 EFQEHTVSTLKGAPPYGVYGGGRLTEAVRRKPSVILLDEVEKAPDVHEIFFQVFDKGTEDGNGRRIDFKNTLITLTNVGTDRINGLSRDPKYRDEPEELAKHLPELLKVFPAALLGRIVSIP  
Consensus EFQEHTVSTLKGAPPYGVYGGGRLTEAVRRKPSVILLDEVEKAPDVHEIFFQVFDKGTEDGNGRRIDFKNTLITLTNVGTDRINGLSRDPKYRDEPEELAKHLPELLKVFPAALLGRIVSIP

781 790 800 810 820 830 840 850 860 870 879

ISLU101\_5981 YFPLSDEMLSGIYRLQLDRIGRRLLDNHNAFEGYDQAVVEHIYSCNDPDSGGRRIDNIITNTLLPELSREFLSKSLAKEEYKARVSIENKFRYSAN  
b113587 YFPLSDEMLSGIYRLQLDRIGRRLLDNHNAFEGYDQAVVEHIYSCNDPDSGGRRIDNIITNTLLPELSREFLSKSLAKEEYKARVSIENKFRYSAN  
Consensus YFPLSDEMLSGIYRLQLDRIGRRLLDNHNAFEGYDQAVVEHIYSCNDPDSGGRRIDNIITNTLLPELSREFLSKSLAKEEYKARVSIENKFRYSAN

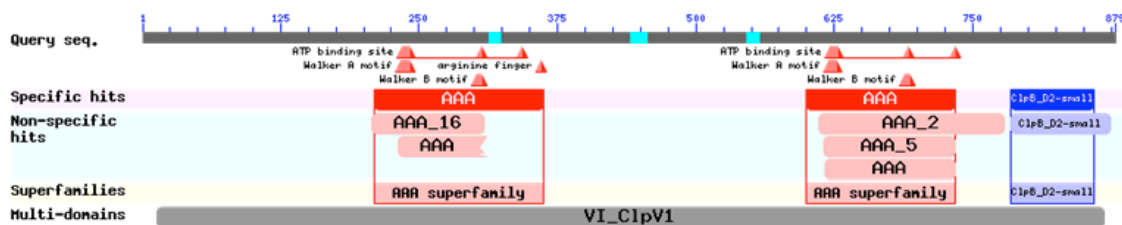


Fig. 27. Alineamiento de proteínas ImpO. En azul se indican los aa diferentes en las dos secuencias. ISLU101 es una cepa de *Bradyrhizobium* sp.; USDA 110 de *B. japonicum*.

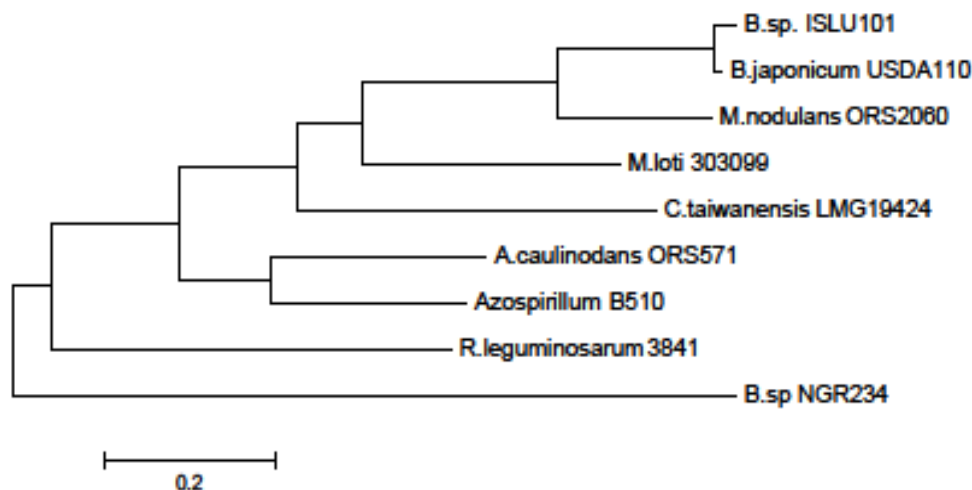


Fig. 28. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en la proteína ImpO de *Bradyrhizobios*. Con un recuadro se destacan la secuencias analizada en este trabajo de la cepa ISLU101. El remuestreo aleatorio o bootstrapping (1.000 replicaciones) se muestra en los nodos de las ramificaciones. La barra horizontal indica la escala con el número de sustituciones por sitio.